(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 391 943**

(51) Int. CI.:

A61K 48/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **00932032 .6**

(96) Fecha de presentación: **03.05.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1181057**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.02.2002**

(54) Título: **Inmunización genética no invasiva, sus productos de expresión y sus usos**

(30) Prioridad:

03.05.1999 US 132216 P
23.03.2000 US 533149

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:

03.12.2012

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:

03.12.2012

(73) Titular/es:

THE UAB RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
SUITE 1120G-AB, 701 SOUTH 20TH STREET
BIRMINGHAM, AL 35294-0111, US

(72) Inventor/es:

TANG, DE-CHU C.;
MARKS, DONALD H.;
CURIEL, DAVID T.;
SHI, ZHONGKAI y
VAN KAMPEN, KENT R.

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inmunización genética no invasiva, sus productos de expresión y sus usos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a los campos de la inmunología y de la tecnología de vacunas. La presente invención también se refiere a técnicas de administración de genes no invasivas para provocar respuestas inmunológicas mediante la administración a la mucosa nasal, y sus usos.

Antecedentes de la invención

La activación del sistema inmunológico de vertebrados es un mecanismo importante para proteger a los animales frente a patógenos y tumores malignos. El sistema inmunológico consiste en muchos componentes que interaccionan entre sí, e incluye las secciones humoral y celular. La inmunidad humoral implica a anticuerpos que se unen directamente a antígenos. Las moléculas de anticuerpos como efectores de la inmunidad humoral son segregadas por linfocitos B. La inmunidad celular implica a los linfocitos C citotóxicos (CTL) especializados que reconocen y matan a otras células que producen antígenos extraños. Los CTL responden a fragmentos peptídicos degradados que aparecen sobre la superficie de la célula diana unida a moléculas del MHC ("major histocompatibility complex", complejo de histocompatibilidad mayor) de clase I. Se sabe que las proteínas producidas dentro de la célula son continuamente degradadas para producir péptidos como parte del metabolismo celular. Estos fragmentos se unen a las moléculas del MHC y son transportados hacia la superficie celular. Por tanto, el sistema inmunológico está constantemente controlando la gama de proteínas producidas en todas las células del cuerpo y está listo para eliminar a cualquier célula que produzca antígenos extraños.

La vacunación es el proceso de cebar a un animal para responder a un antígeno. El antígeno puede administrarse como una proteína (la forma clásica) o como un gen que después expresa el antígeno (inmunización genética). El proceso implica a los linfocitos T y B, a otros tipos de células linfoides, así como a células de presentación de antígenos especializadas (APC) que pueden procesar el antígeno y presentarlo en una forma que puede activar al sistema inmunológico. Los modos de administración actuales de las vacunas genéticas se han centrado en procedimientos invasivos, que incluyen inyecciones con aguja, escarificación, y penetración mediada por pistola de genes. La inoculación de vacunas en un modo invasivo requiere equipo y personal con formación médica especial, y habitualmente se asocia con molestias y peligros potenciales (sangrado, infección).

La eficacia de una vacuna se mide por el grado de protección frente a una exposición posterior a un patógeno o tumor. Las vacunas eficaces son inmunógenos que pueden inducir una inmunidad protectora de larga duración y alta titulación para la intervención dirigida contra enfermedades después de un número mínimo de inoculaciones. Por ejemplo, la inmunización genética es una estrategia para provocar respuestas inmunológicas contra proteínas específicas mediante la expresión de genes que codifican las proteínas en las propias células de un animal. La sustancial amplificación del antígeno y estimulación inmunológica que resultan de una presentación de antígenos prolongada *in vivo* puede inducir una sólida inmunidad contra el antígeno. La inmunización genética simplifica el protocolo de vacunación para producir respuestas inmunológicas contra proteínas concretas porque se eliminan las etapas, a menudo difíciles, de la purificación de proteínas y la combinación con adyuvantes, siendo ambas necesarias habitualmente para el desarrollo de vacunas. Puesto que la inmunización genética no requiere el aislamiento de proteínas, es especialmente valiosa para proteínas que pueden perder los epitopos conformacionales cuando se purifican de modo bioquímico. Las vacunas genéticas también pueden administrarse en combinación sin provocar interferencias ni afectar a la eficacia (Tang *et al.*, 1992; Barry *et al.*, 1995), lo cual puede simplificar el programa de vacunación frente a múltiples antígenos.

Aunque se han estudiado vacunas basadas en proteínas de aplicación tópica, su utilidad puede ser limitada. Aunque la aplicación tópica de vacunas basadas en proteínas junto con la toxina del cólera también puede inmunizar a animlaes de un modo no invasivo (Glenn *et al.*, 1998), las vacunas genéticas no invasivas dirigidas a la piel, según se describen en la presente invención, activan el sistema inmunológico a través de un mecanismo diferente al de las vacunas basadas en proteínas. Además, la eficacia de las vacunas genéticas en general es mayor al de las vacunas de proteínas, debido a la síntesis *de novo* de antígenos similares a las infecciones naturales (McDonnell y Askari, 1996). Aunque la patente de EEUU nº 3.837.340 se refiere a un método para vacunar animales poniendo en contacto la piel con virus secados, los virus que se emplean en esta no son vectores genéticos capaces de expresar transgenes o moléculas de ácidos nucleicos heterólogos o exógenos. Además, el inmunógeno puede ser una proteína de la envuelta vírica, en lugar de una proteína producida a partir de la expresión de genes víricos dentro de las propias células del animal, por ejemplo, cualquier respuesta inmunológica inducida por la patente de EEUU nº 3.837.340 puede ser parecida a la inducida por la aplicación tópica de vacunas basadas en proteínas que no sean análogas a las de la presente invención, y por tanto la patente de EEUU nº 3.837.340 no es análoga a la presente invención.

La técnica anterior de la vacunación normalmente requiere un equipo, por ejemplo, agujas para jeringas o una pistola de genes, y conocimientos especiales para la administración de las vacunas. Es muy necesario y deseable en la técnica contar con personal sin formación médica y no necesitar equipo para la inoculación de vacunas.

El documento WO 99/08713, publicado el 25 de febrero de 1995, describe un método para inducir una respuesta inmunológica de un modo no invasivo, que comprende la etapa de poner en contacto la piel de un individuo que necesita dicho tratamiento aplicando por vía tópica a dicha piel una concentración inmunológicamente eficaz de un vector genético que codifica un gen de interés.

Shi *et al.* (en el artículo titulado "DNA-based non-invasive vaccination onto the skin ", Vaccine, vol. 17, nº 17, 23 de marzo de 1999, pp. 2136-2141) indican que una vacunación no invasiva sobre la piel (NIVS) podría mejorar los programas de vacunación porque el procedimiento no requiere personal con formación especializada y puede eliminar muchos de los problemas asociados con las inyecciones con aguja. Además, Shi *et al.* indican que los resultados obtenidos pueden proporcionar un estudio preliminar de eficacia que indique que la NIVS puede ser un nuevo método para la administración de vacunas basadas en ADN.

Papp *et al.* (en el artículo titulado "Induction of immunity in the respiratory tract and protection from bovine herpesvirus type I infection by different routes of immunization with recombinant adenovirus", Immunology, vol. 11, nº 2, 1998, pp. 79-91) describen una investigación de la capacidad de diferentes vías de inmunización con recombinantes adenovíricos competentes en la replicación para inducir respuestas de anticuerpos específicas de antígeno.

Objetos y resumen de la invención

Una vacunación no invasiva sobre la piel (NIVS) puede mejorar los programas de vacunación, porque la piel es un tejido inmunocompetente y este procedimiento no invasivo no requiere un personal con una formación especializada. La administración de genes no invasiva dirigida a la piel puede lograr la expresión de transgenes localizada en la piel y puede provocar respuestas inmunológicas (Tang *et al.*, 1997), y el mecanismo para estas respuestas es diferente del de la aplicación tópica de vacunas basadas en proteínas junto con la toxina del cólera (Glenn *et al.*, 1998). Estos resultados indican que la NIVS basada en vectores es un método nuevo y eficaz para la administración de vacunas. El protocolo de inmunización sencillo, eficaz, barato e indoloro descrito en la presente invención debería hacer que la vacunación dependa menos de los recursos médicos y, por tanto, aumentará la tasa de utilización anual de vacunaciones.

La presente invención proporciona el uso de un vector adenovírico según se define en la reivindicación independiente 1. La invención también proporciona un vector adenovírico para su uso según se define en la reivindicación independiente 11.

Además, la invención proporciona una composición, concretamente una vacuna no invasiva para la administración mucosa, para su uso según se define en la reivindicación independiente 21.

La invención también incluye un kit según se define en la reivindicación independiente 29. Este kit comprende el vector y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable o adecuado, y un dispositivo de administración opcional, cada uno en su propio envase; el envase puede incluirse en un recipiente unitario, o los envases pueden estar cada uno en recipientes separados o cada uno puede ser su propio recipiente separado; el kit puede incluir opcionalmente instrucciones para la mezcla de los ingredientes y/o la administración de la composición.

Se describen formulaciones de vertido y de rociado en las patentes de EEUU nº 6.010.710 y 5.475.005. También se describe un dispositivo aplicador de tapón de bola en la patente de EEUU nº 5.897.267. Además, los expertos en la técnica también sabrán fabricar una formulación en champú, así como dispositivos para aplicar la formulación a un animal.

Las realizaciones preferidas se mencionan en las reivindicaciones dependientes.

Se hace notar que, en esta descripción, los términos y las expresiones tales como "comprende", "que comprende" y similares pueden tener el significado atribuido en la ley de patentes de EEUU, por ejemplo, pueden significar "incluye", "que incluye" y similares.

Estas y otras realizaciones se describen o resultan obvias a partir de la siguiente descripción detallada y están incluidas en ésta.

Breve descripción de las figuras

La siguiente descripción detallada, que se ofrece como ejemplo pero no pretende limitar la invención a las realizaciones específicas descritas en ella, puede entenderse junto con las figuras adjuntas, incorporadas en la presente como referencia, en las que:

la figura 1 muestra la expresión de trangenes a partir de recombinantes adenovíricos en la piel mediante la aplicación tópica de los vectores;

las figuras 2a y 2b muestran la caracterización de las células diana potenciales que pueden transducirse mediante recombinantes adenovíricos aplicados por vía tópica;

las figuras 3a y 3b muestran la detección de anticuerpos específicos en el suero de ratones inmunizados mediante una NIVS mediada por adenovirus;

la figura 4 muestra el porcentaje de supervivencia de ratones control frente a inmunizados que fueron expuestos a una dosis letal de células tumorales;

la figura 5 muestra la caracterización de linfocitos T de infiltración de tumores;

la figura 6 muestra la caracterización de CTL de infiltración de tumores;

la figura 7 muestra el análisis de la transferencia Western de anticuerpos contra la proteína CEA humana en ratones inmunizados mediante la aplicación tópica de vendajes de vacuna;

la figura 8a muestra la detección de anticuerpos específicos en el suero de un ratón inmunizado mediante una NIVS mediada por ADN/adenovirus;

la figura 8b muestra la detección de anticuerpos específicos en el suero de un ratón inmunizado mediante una NIVS mediada por ADN/liposomas;

la figura 9 muestra la coexpresión de transgenes codificados por ADN y codificados por adenovirus en células diana;

la figura 10 muestra la expresión de transgenes relativa a partir de recombinantes adenovíricos aplicados por vía tópica, complejos de ADN/adenovirus; y complejos de ADN/liposomas;

la figura 11 muestra un dispositivo para la administración de vacunas no invasivas dirigidas a la piel;

la figura 12 muestra anticuerpos anti-gripe generados mediante vacunas no invasivas dirigidas a la piel en ratones;

la figura 13 muestra la protección de ratones frente a la muerte tras la exposición a virus;

la figura 14 muestra anticuerpos de ELISA generados en un macaco cola de cerdo mediante un parche dérmico que contiene un vector adenovírico que codifica HA de la gripe;

la figura 15 muestra el traslado de manchas de antígeno en la piel después de la aplicación tópica de un vector adenovírico;

la figura 16 muestra la amplificación de ADN extraño en diversos tejidos después de la administración de genes localizada en un modo no invasivo;

la figura 17 demuestra que un agente depilador, tal como NAIR, no es fundamental para la NIVS;

la figura 18 muestra la protección frente a la muerte tras una exposición de *Clostridium tetani* mediante la aplicación tópica o la inoculación intranasal de una vacuna del tétanos basada en adenovirus.

Descripción detallada

La inoculación de vacunas en un modo no invasivo puede resultar innecesaria (Tang *et al.*, 1997; Glenn *et al.*, 1998). Puesto que la piel forma una interfase directamente con el entorno externo y está en contacto constante con patógenos potenciales, el sistema inmunológica debe mantener constantemente un ejército biológico movilizado a lo largo de la frontera de la piel para rechazar infecciones potenciales. Como consecuencia, la capa externa de la piel es fundamentalmente un tejido inmunocompetente. Los componentes inmunológicos presentes en la piel para provocar respuestas inmunológicas celulares citotóxicas y humorales incluyen células de Langerhans epidérmicas (que son células presentadoras de antígenos de MHC de clase II positivas), queratinocitos, y linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$. Estos componentes hacen que la piel sea un sitio ideal para la administración de vacunas. La enorme área accesible de la piel y su durabilidad son otras ventajas para aplicar vacunas a este tejido. La expresión de un pequeño número de antígenos en la capa externa de la piel sin penetración física puede por tanto provocar una potente respuesta inmunológica alertando al mecanismo de vigilancia inmunológico.

En la presente se demuestra que pueden inocularse vacunas genéticas de una nueva manera en forma de una vacuna no invasiva dirigida a la piel, o composiciones inmunogénicas, inmunológicas o terapéuticas. La combinación de vacunas genéticas con un modo de administración no invasivo produce una nueva clase de vacunas “democráticas”, o composiciones inmunogénicas, inmunológicas o terapéuticas que pueden requerir pocos o ningún conocimento especial ni equipo para la administración. Por tanto, un individuo puede administrar estas composiciones sobre su propia piel (y esta administración, de forma ventajosa, puede estar supervisada por un médico, por ejemplo para asegurarse de que la dosificación sea apropiada) o sobre la piel de animales (por ejemplo, de forma ventajosa un área rasurada de la piel si el animal es un mamífero, aunque tal como se demuestra en la presente, no es necesario eliminar el pelo, y de forma más ventajosa en una región en la que el animal no pueda

eliminar la administración mediante frotamiento, acicalamiento u otra actividad); y así, la presente invención describe ventajas en la administración de vacunas, o composiciones inmunogénicas, inmunológicas o terapéuticas, que comprenden un vector que expresa un producto génico, en especial con respecto a la administración de dichos compuestos a recién nacidos, animales jóvenes, animales en general, niños y niñas y similares, en los cuales la administración invasiva, por ejemplo con una aguja, puede ser algo difícil, molesta o dolorosa.

Tal como se utiliza en la presente, un vector es una herramienta que permite o facilita la transferencia de una entidad desde un entorno a otro. Como ejemplo, algunos vectores utilizados en técnicas de ADN recombinante permiten que entidades, tales como un segmento de ADN (por ejemplo un segmento de ADN heterólogo, tal como un segmento de ADNc heterólogo), puedan ser transferidas hacia una célula diana.

Tal como se emplea en la presente, "AdCMV-tetC:IM" representa un vector adenovírico que codifica el fragmento C de la toxina de *Clostridium tetani*; "pCMV-tetC" representa un vector de expresión plasmídico que codifica el fragmento C de la toxina de *Clostridium tetani*.

Se hace referencia a la patente de EEUU nº 5.990.091, otorgada el 23 de noviembre de 1999, Einat *et al.* o Quark Biotech, Inc., documento WO 99/60164, publicado el 25 de noviembre de 1999 del documento PCT/US99/11066, presentado el 14 de mayo de 1999, Fischer o Rhone Merieux, Inc., documento WO 98/00166, publicado el 8 de enero de 1998 del documento PCT/US97/11486, presentado el 30 de junio de 1997 (que reivindica la prioridad de las solicitudes de EEUU nº de serie 08/675.556 y 08/675.566), van Ginkel *et al.*, J. Immunol., 159(2):685-693 (1997) ("Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene"), Osterhaus *et al.*, Immunobiology, 184(2-3):180-192 (1992) ("Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man"), Briles *et al.* o UAB, documento WO 99/53940, publicado el 28 de octubre de 1999 del documento PCT/US99/08895, presentado el 23 de abril de 1999, y Briles *et al.* o UAB, patente de EEUU nº 6.042.838, otorgada el 28 de marzo de 2000, y Briles *et al.* o UAB, patente de EEUU nº 6.004.802, para información acerca de productos génicos expresados, anticuerpos y sus usos, vectores para la expresión *in vivo* e *in vitro* de moléculas de ácidos nucleicos exógenas, promotores para dirigir la expresión o para unirse operativamente a moléculas de ácidos nucleicos que se van a expresar, métodos y documentos para producir estos vectores, composiciones que comprenden dichos vectores o moléculas de ácidos nucleicos o anticuerpos, dosificaciones, y modos y/o vías de administración (incluyendo composiciones para la administración mucosa, nasal, oral, a la cavidad oral, bucal, perlingual); y, por tanto, la patente de EEUU nº 5.990.091, otorgada el 23 de noviembre de 1999, Einat *et al.* o Quark Biotech, Inc., documento WO 99/60164, publicado el 25 de noviembre de 1999 del documento PCT/US99/11066, presentado el 14 de mayo de 1999, Fischer o Rhone Merieux, Inc., documento WO 98/00166, publicado el 8 de enero de 1998 del documento PCT/US97/11486, presentado el 30 de junio de 1997 (que reivindica la prioridad de las solicitudes de EEUU nº de serie 08/675.556 y 08/675.566), van Ginkel *et al.*, J. Immunol., 159(2):685-693 (1997) ("Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene"), Osterhaus *et al.*, Immunobiology, 184(2-3):180-192 (1992) ("Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man"), Briles *et al.* o UAB, documento WO 99/53940, publicado el 28 de octubre de 1999 del documento PCT/US99/08895, presentado el 23 de abril de 1999, y Briles *et al.* o UAB, patente de EEUU nº 6.042.838, otorgada el 28 de marzo de 2000, y Briles *et al.* o UAB, patente de EEUU nº 6.004.802, y todos los documentos citados o referenciados en ellos, y todos los documentos citados o referenciados en los documentos referenciados o citados en cada uno de la patente de EEUU nº 5.990.091, otorgada el 23 de noviembre de 1999, Einat *et al.* o Quark Biotech, Inc., documento WO 99/60164, publicado el 25 de noviembre de 1999 del documento PCT/US99/11066, presentado el 14 de mayo de 1999, Fischer o Rhone Merieux, Inc., documento WO 98/00166, publicado el 8 de enero de 1998 del documento PCT/US97/11486, presentado el 30 de junio de 1997 (que reivindica la prioridad de las solicitudes de EEUU nº de serie 08/675.556 y 08/675.566), van Ginkel *et al.*, J. Immunol., 159(2):685-693 (1997) ("Adenoviral gene delivery elicits distinct pulmonary-associated T helper cell responses to the vector and to its transgene"), Osterhaus *et al.*, Immunobiology, 184(2-3):180-192 (1992) ("Vaccination against acute respiratory virus infections and measles in man"), Briles *et al.* o UAB, documento WO 99/53940, publicado el 28 de octubre de 1999 del documento PCT/US99/08895, presentado el 23 de abril de 1999, y Briles *et al.* o UAB, patente de EEUU nº 6.042.838, otorgada el 28 de marzo de 2000, y Briles *et al.* o UAB, patente de EEUU nº 6.004.802. La información en la patente de EEUU nº 5.990.091, otorgada el 23 de noviembre de 1999, documento WO 99/60164, documento WO 98/00166, van Ginkel *et al.*, J. Immunol., 159(2):685-693 (1997), Osterhaus *et al.*, Immunobiology, 184(2-3):180-192 (1992), documento WO 99/53940 y las patentes de EEUU nº 6.042.838 y 6.004.802 resulta fiable para la práctica de esta descripción (por ejemplo, productos expresados, anticuerpos y sus usos, vectores para la expresión *in vivo* e *in vitro* de moléculas de ácidos nucleicos exógenas, moléculas de ácidos nucleicos exógenas que codifican epitopos de interés o antígenos o productos terapéuticos y similares, promotores, composiciones que comprenden dichos vectores o moléculas de ácidos nucleicos o productos expresados o anticuerpos, dosificaciones, entre otros). Se advierte que los productos inmunológicos y/o anticuerpos y/o productos expresados obtenidos según esta invención pueden expresarse *in vitro* y utilizarse de una manera en la que se utilizan generalmente dichos productos inmunológicos y/o expresados y/o anticuerpos, y que las células que expresan dichos productos inmunológicos y/o expresados y/o anticuerpos pueden emplearse aplicaciones *in vitro* y/o *ex vivo*, por ejemplo, estos usos y aplicaciones pueden incluir diagnósticos, ensayos, terapia *ex vivo* (por ejemplo, en la que células que expresan el producto génico y/o una respuesta inmunológica se expanden *in vitro* y se reintroducen en el hospedante o animal), etc.; véase la patente de EEUU 5.990.091, documento WO 99/60164, documento WO 98/00166, documento WO 99/53940 y las patentes de EEUU nº 6.042.838 y 6.004.802, y los

documentos citados en ellos y los documentos citados o referenciados en dichos documentos. Además, los anticuerpos expresados o productos génicos que se aislan de los presentes métodos, o que se aislan de células expandida *in vitro* tras los métodos de administración de la presente, pueden administrarse en composiciones, de forma parecida a la administración de subunidades de epitopos o antígenos o productos terapéuticos o anticuerpos para inducir inmunidad, estimular una respuesta terapéutica y/o estimular la inmunidad pasiva. La cantidad que se va a administrar variará según el paciente (hospedante) y el trastorno que se está tratando, y variará de uno o a unos pocos microgramos, o de unos pocos cientos o miles de microgramos, por ejemplo, de 1 μg a 1 mg, de aproximadamente 100 ng/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal diarios, y preferiblemente será de aproximadamente 10 pb/kg a 10 mg/kg diarios. Un vector puede administrarse de forma no invasiva a un paciente u hospedante en una cantidad para lograr las cantidades indicadas para las composiciones de productos génicos (por ejemplo, epitopo, antígeno, producto terapéutico y/o anticuerpo). Por supuesto, la invención contempla dosificaciones menores y mayores que las ejemplificadas en la presente, y para cualquier composición que vaya a ser administrada a un animal o ser humano, incluyendo sus componentes, y para cualquier método concreto de administración, se prefiere determinar para ellos: la toxicidad, tal como determinando la dosis letal (DL) y DL_{50} en un modelo animal adecuado, por ejemplo, un roedor, tal como un raton, y la dosificación de la composición o composiciones, la concentración de sus componentes y la programación para administrar la composición o composiciones, que provoquen una respuesta adecuada, tal como mediante titulaciones de sueros y sus análisis, por ejemplo mediante análisis ELISA y/o de seroneutralización. Estas determinaciones no requieren experimentación indebida por el conocimiento de los expertos en la técnica, esta descripción y los documentos citados en la presente. Y la invención también comprende la administración secuencial de las composiciones de la invención, o la actuación secuencial de los métodos de la presente, por ejemplo, la administración periódica de las composiciones de la invención, tal como en el desarrollo de una terapia o tratamiento para un trastorno y/o la administración de refuerzo de composiciones inmunológicas y/o en regímenes de cebado-refuerzo; y el momento y la manera de realizar las administraciones secuenciales pueden ser determinados sin experimentación indebida. Además, la invención describe composiciones y métodos para fabricar y utilizar vectores, incluyendo métodos para producir productos génicos y/o productos inmunológicos y/o anticuerpos *in vivo* y/o *in vitro* y/o *ex vivo* (realizándose los dos últimos, por ejemplo, después de su aislamiento de células procedentes de un hospedante al que se le ha sometido a una administración no invasiva según la invención, por ejemplo después de la expansión opcional de dichas células), y usos para dichos productos génicos y/o inmunológicos y/o anticuerpos, incluyendo en diagnósticos, ensayos, terapias, tratamientos y similares. Las composiciones de vectores se formulan mezclando el vector con un vehículo o diluyente adecuado; y las composiciones de productos génicos y/o de productos inmunológicos y/o de anticuerpos se formulan de modo similar mezclando el producto génico y/o inmunológico y/o anticuerpo con un vehículo o diluyente adecuado; véase, por ejemplo, la patente de EEUU 5.990.091, documento WO 99/60164, documento WO 98/00166, documento WO 99/53940 y las patentes de EEUU nº 6.042.838 y 6.004.802, y los documentos citados en ellos y otros documentos citados en la presente, y otras indicaciones en la presente (por ejemplo, con respecto a vehículos, diluyentes y similares).

Si se desea una administración nasal o respiratoria (mucosa), las composiciones pueden estar en forma adecuada y dispensarse mediante un dispensador de pulverización por compresión manual, un dispensador de bomba o un dispensador de aerosol. Estos dispensadores también pueden utilizarse para administrar la composición a la mucosa oral o de la cavidad oral (por ejemplo, bucal o perlingual). Los aerosoles habitualmente está a presión por medio de un hidrocarburo. Los dispensadores de bomba pueden dispensar preferiblemente una dosis medida o una dosis que tenga un tamaño de partícula adecuado.

Las composiciones descritas en la invención pueden contener aromas y/o colorantes farmacéuticamente aceptables para hacer que sean más atractivas, en especial si se van a administrar por vía oral (o bucal o perlingual) y, así, estas composiciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas que se disuelven en la boca o que se muerden para liberar un líquido para la absorción por vía bucal o perlingual (similar a los medicamentos orales, perlinguales o bucales para la angina, tales como nitroglicerina o nifedimeno). Las composiciones viscosas pueden estar en forma de geles, lociones, ungüentos, cremas y similares (por ejemplo, para la administración tópica y/o mucosa y/o nasal y/u oral y/o a la cavidad oral y/o perlingual y/o bucal), y generalmente contendrán una cantidad suficiente de un agente espesante de modo que su viscosidad sea de aproximadamente 2500 a 6500 cps, aunque pueden emplearse composiciones más viscosas, incluso hasta 10.000 cps. Las composiciones viscosas tienen una viscosidad preferiblemente de 2500 a 5000 cps, puesto que por encima de este intervalo son más difíciles de administrar. Sin embargo, por encima de este intervalo, las composiciones pueden aproximarse a formas sólidas o de gelatina que entonces pueden administrarse con facilidad en forma de una píldora tragada para la ingestión oral y/o una píldora o cápsula o comprimida para llevar en la boca, por ejemplo, para la administración bucal o perlingual.

Las preparaciones líquidas normalmente son más fáciles de preparar que los geles, otras composiciones viscosas y las composiciones sólidas. Además, las composiciones líquidas son algo más cómodas de administrar, en especial mediante inyección o por vía oral, bucal o perlingual, a animales, niños, en particular niños pequeños, y otros que puedan tener dificultadas para tragar una píldora, comprimido, cápsula o similares, o en situaciones de múltiples dosis. Las composiciones viscosas, por otra parte, pueden formularse dentro del intervalo de viscosidad apropiado para proporcionar periodos de contacto más largos con la mucosa, tal como el revestimiento del estómago o la mucosa nasal, o para la absorción perlingual, bucal o en la cavidad oral.

Obviamente, la elección de los vehículos adecuados y otros aditivos dependerá de la vía exacta de administración y de la naturaleza de la forma de dosificación concreta, por ejemplo, una forma de dosificación líquida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una disolución, una suspensión, un gel u otra forma líquida), o una forma de dosificación sólida (por ejemplo, si la composición se va a formular en una píldora, un comprimido, una cápsula, un comprimido oblongo, una forma de liberación en el tiempo, o una forma rellena de líquido).

Las suspensiones y los geles normalmente contienen una cantidad importante de agua (preferiblemente agua purificada) además del antígeno, lipoproteínas y adyuvante opcional. También pueden estar presentes cantidades pequeñas de otros ingredientes, tales como ajustadores del pH (por ejemplo, una base, tal como NaOH), emulgentes o agentes dispersantes, agentes tamponantes, conservantes, agentes humectantes, agentes gelificantes (por ejemplo, metilcelulosa), colorantes y/o aromas. Las composiciones pueden ser isotónicas, es decir, pueden tener la misma presión osmótica que la sangre y el fluido lacrimal.

Puede alcanzarse la isotonicidad deseada de las composisiones descritas en la invención utilizando cloruro de sodio u otros agentes farmacéuticamente aceptables, tales como dextrosa, ácido bórico, tartrato de sodio, propilenglicol u otros solutos inorgánicos u orgánicos. El cloruro de sodio es particularmente preferido para tampones que contienen iones de sodio.

La viscosidad de las composiciones puede mantenerse al nivel seleccionado utilizando un agente espesante farmacéuticamente aceptable. Se prefiere la metilcelulosa porque puede adquirirse con facilidad y es barata, y es fácil trabajar con ella. Otros agentes espesantes adecuados incluyen, por ejemplo, goma de xantano, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carbómero y similares. La concentración preferida del espesante dependerá del agente seleccionado. El punto importante es utilizar una cantidad que pueda lograr la viscosidad seleccionada. Las composiciones viscosas se preparan normalmente a partir de disoluciones mediante la adición de dichos agentes espesantes.

Puede emplearse un conservante farmacéuticamente aceptable para aumentar la caducidad de las composiciones. El alcohol bencílico puede ser adecuado, aunque también puede emplearse una diversidad de conservantes que incluyen, por ejemplo, parabenos, timerosal, clorobutanol, o cloruro de benzalconio. Una concentración adecuada del conservante será del 0,02% al 2% basado en el peso total, aunque puede haber variaciones apreciables dependiendo del agente seleccionado.

Los expertos en la técnica reconocerán que los componentes de las composiciones deben seleccionarse para que sean químicamente inertes con respecto al vector, antígeno o epitopo de interés y el adyuvante opcional u otros ingredientes activos o potenciadores de la inmunidad. Esto no será un problema para los expertos en la técnica química y farmacéutica, o los problemas que surjan pueden evitarse con facilidad haciendo referencia a los textos convencionales o a experimentos sencillos (que no impliquen una experimentación indebida), a partir de esta descripción y de los documentos citados en ella.

Las composiciones inmunológicamente eficaces descritas en la invención se preparan mezclando los ingredientes siguiente procedimientos generalmente aceptados. Por ejemplo, los componentes seleccionados pueden mezclarse simplemente en un mezclador u otro dispositivo convencional para producir una mezcla concentrada que entonces puede ajustarse a la concentración y la viscosidad finales mediante la adición de agua o de un agente espesante y quizás un tampón para controlar el pH o un soluto adicional para controlar la tonicidad. En general, el pH puede ser de aproximadamente 3 a 7,5. Las composiciones pueden administrarse en dosificaciones y mediante técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica médica y veterinaria tomando en consideración factores tales como la edad, el sexo, el peso y el trastorno del paciente o animal concreto, y la forma de la composición utilizada para la administración (por ejemplo, sólida frente a líquida). Las dosificaciones para seres humanos u otros mamíferos pueden ser determinadas sin experimentación indebida por los expertos en la técnica, a partir de esta descripción, de los documentos citados en ella, de los siguientes ejemplos, y de las solicitudes, patentes y otros documentos citados en la presente, y de los documentos citados o referenciados en los documentos citados en la presente, todos los cuales se incorporan en la presente como referencia.

Los regímenes adecuados para la administración inicial y las dosis de refuerzo o para las administraciones secuenciales también son variables, y pueden incluir una administración inicial, seguida de posteriores administraciones; no obstante, pueden ser determinadas por los expertos en la técnica a partir de esta descripción, de los documentos citads e incorporados como referencia en la presente, incluyendo las solicitudes y las patentes citadas en la presente y los documentos referenciados o citados en los documentos citados en la presente, todos los cuales se incorporan en la presente como referencia, así como los siguientes ejemplos. Las composiciones pueden administrarse por sí solas, o pueden coadministrarse o administrarse de modo secuencial con otras composiciones de la invención o con otras composiciones profilácticas o terapéuticas.

El vector expresa un gen que codifica la hemaglutinina de la gripe y/o la proteína nuclear de la gripe.

En una realización de la invención, la respuesta inmunológica en el animal es inducida por vectores genéticos que expresan genes que codifican antígenos de interés en las células del animal, concretamente la hemaglutinina de la gripe y/o la proteína nuclear de la gripe. En otra realización, el vector genético se utiliza como vacuna profiláctica o

vacuna terapéutica. En otra realización de la invención, el vector genético comprende vectores genéticos capaces de expresar un antígeno de interés en las células del animal. En otra realización del método, el animal es un vertebrado.

Con respecto al ADN exógeno para la expresión en un vector (por ejemplo, que codifica un epitopo de interés y/o un antígeno y/o un producto terapéutico) y los documentos que proporcionan dicho ADN exógeno, así como con respecto a la expresión de los factores de transcripción y/o traducción para potenciar la expresión de moléculas de ácidos nucleicos, y con respecto a los términos y expresiones tales como “epitopo de interés”, “terapéutico”, “respuesta inmunológica”, “respuesta inmunológica protectora”, “composición inmunológica”, “composición inmunogénica” y “composición de vacuna”, entre otros, se hace referencia a la patente de EEUU 5.990.091, otorgada el 23 de noviembre de 1999, y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164, y los documentos citados en ellos y los documentos de registro en el proceso de esta patente y las solicitudes PCT. Así, la patente de EEUU 5.990.091, y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164, y los documentos citados en ellos y los documentos de registro en el proceso de esta patente y las solicitudes PCT, y otros documentos citados en la presente o incorporados de otra manera en la presente como referencia, pueden consultarse en la práctica de la invención; y todas las moléculas de ácidos nucleicos exógenas, promotores, y vectores citados en ellos pueden utilizarse en la práctica de esta invención. A este respecto, también se mencionan las patentes de EEUU nº 6.004.777, 5.997.878, 5.989.561, 5.976.552, 5.972.597, 5.858.368, 5.863.542, 5.833.975, 5.863.542, 5.843.456, 5.766.598, 5.766.597, 5.762.939, 5.756.102, 5.756.101, 5.494.807, 6.042.838, 6.004.802 y documento WO 99/53940.

En otra realización de la invención, el animal es, de forma ventajosa, un vertebrado, tal como un mamífero, un ave, un reptil, un anfibio o un pez; de forma más ventajosa es un ser humano, o un animal de compañía o domesticado, o productor de alimento o de pienso, o ganado o de caza, de carreras o deportivo, tal como un vaca, un perro, un gato, una cabra, una oveja, o un cerdo o un caballo, e incluso aves de corral, tales como pavos, patos o pollos. En otra realización especialmente ventajosa de la invención, el vertebrado es un ser humano. En otra realización de la invención, la respuesta inmunológica es contra la gripe A. En otra realización de la invención, la respuesta inmunológica contra la gripe A es inducida por el vector genético que expresa un gen que codifica una hemaglutinina de la gripe y/o una proteína nuclear de la gripe, o un fragmento de estas en las células del animal. En la presente invención, el vector genético es un adenovirus defectuoso en sus regiones E1 y E3. En otra realización de la invención, el ADN está en forma plasmídica. En otra realización de la invención, al vector se le han delecionado todos los genes víricos.

En otra realización de la presente invención, el vector contiene también un gen seleccionado del grupo que consiste en genes coestimulatorios y genes de citoquinas. En este método, el gen se selecciona del grupo que consiste en un gen de GM-CSF, un gen de B7-1, un gen de B7-2, un gen de interleuquina-2, un gen de interleuquina-12, y genes de interferón.

Las realizaciones de la invención que emplean recombinante adenovíricos incluyen los vectores adenovíricos defectuosos en E1 y defectuosos en E3, o el vector adenovírico sin secuencias codificantes (“gutless”) en el que todos los genes víricos se han delecionado. La mutación de E1 aumenta el margen de seguridad del vector, porque los mutantes adenovíricos defectuosos en E1 son incompetentes para la replicación en células no permisivas. La mutación de E2 potencia la inmunogenicidad del antígeno alterando el mecanismo mediante el cual el adenovirus infrarregula las moléculas del MHC de clase I. El vector adenovírico “gutless” es el último modelo en la familia de vectores adenovíricos. Su replicación requiere de un virus auxiliar y una línea celular 293 humana especial que expresa ambos E1a y Cre, una condición que no existe en el entorno natural; al vector se le han eliminado todos los genes víricos, por tanto el vector, como vehículo de vacuna, no es inmunogénico y puede inocularse muchas veces para la revacunación. El vector adenovírico “gutless” también contiene un espacio de 36 kb para introducir transgenes, permitiendo así la coadministración de un gran número de genes de antígenos a las células. Pueden insertarse motivos de secuencia específicos, tales como el motivo RGD, en el bucle H-I de un vector adenovírico para potenciar su infectividad. Un recombinante adenovírico se construye clonando transgenes específicos o fragmentos de transgenes en cualquiera de los vectores adenovíricos, tales como los descritos anteriormente. El recombinante adenovírico se utiliza para transducir las células epidérmicas de un vertebrado de un modo no invasivo para su uso como un agente inmunizante.

Las realizaciones que utilizan complejos de ADN/adenovirus pueden presentar el ADN plasmídico complejado con vectores adenovíricos utilizando un agente adecuado para ello, tal como PEI (polietilenimina) o polilisina. El vector adenovírico dentro del complejo puede estar “vivo” o “muerto” mediante irradiación con UV o rayos gamma. El vector adenovírico inactivado por irradiación, como ligando de unión a un receptor y como agente de endosomolisis para facilitar la transfección mediada por ADN (Cotten *et al.*, 1992), puede aumentar el margen de seguridad del vehículo de vacuna. El complejo de ADN/adenovirus se emplea para transfectar las células epidérmicas de un vertebrado de un modo no invasivo para su uso como agente inmunizante.

Las realizaciones que emplean complejos de ADN/liposomas puede poseer materiales para formar liposomas, y pueden formarse complejos de ADN/liposomas a partir de estos materiales. El complejo de ADN/liposomas se utiliza para transfectar las células epidérmicas de un vertebrado de un modo no invasivo para su uso como agente inmunizante.

Los vectores genéticos descritos en la invención también pueden codificar moléculas inmunomoduladoras que pueden actuar como adyuvante para provocar una respuesta inmunológica humoral y/o celular. Estas moléculas incluyen citoquinas, moléculas coestimulatorias, o cualquier molécula que pueda cambiar el curso de una respuesta inmunológica. Se pueden concebir maneras en las que esta tecnología pueda modificarse para potenciar aún más la inmunogenicidad de antígenos.

Las formas de dosificación para la administración tópica del vector genético y el gen de interés de esta invención pueden incluir líquidos, ungüentos, polvos y pulverizados. El componente activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un vehículo fisiológicamente aceptable y cualquier conservante, tampón, propelente o potenciador de la absorción que sea necesario o deseado. Se hace referencia a los documentos citados en la presente, por ejemplo, las patentes de EEUU nº 5.990.091, 6.042.838 y 6.004.802, y los documentos WO 98/00166 y WO 99/60164, y el documento WO 99/53940, y los documentos citados en ellos para conocer métodos para construir vectores, así como para composiciones para la aplicación tópica, por ejemplo, composiciones viscosas que pueden ser cremas o ungüentos, así como composiciones para la administración nasal.

En términos de la terminología utilizada en la presente, una cantidad inmunológicamente eficaz es una cantidad o concentración del vector genético que codifica el gen de interés que, cuando se administra a un animal, produce una respuesta inmunológica frente al producto génico de interés.

Diversos epitopos, antígenos o productos terapéuticos pueden administrarse por vía tópica mediante su expresión a diferentes concentraciones. En general, las cantidades útiles para los vectores adenovíricos son al menos aproximadamente 100 pfu, y para el ADN plasmídico al menos aproximadamente 1 ng de ADN. Pueden determinarse otras cantidades a partir de esta descripción y del conocimiento de la técnica, incluyendo los documentos citados e incorporados en la presente como referencia, sin experimentación indebida.

Los métodos descritos en la invención pueden aplicarse de modo apropiado para prevenir enfermedades como vacunación profiláctica, o para tratar enfermedades como vacunación terapéutica.

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse a un animal por sí solas o como parte de una composición inmunológica.

Más allá de las vacunas humanas descritas, el método de la invención puede utilizarse para inmunizar ganado animal. El término animal significa todos los animales, incluyendo seres humanos. Los ejemplos de animales incluyen seres humanos, vacas, perros, gatos, cabras, ovejas, caballos, cerdos, pavos, patos y pollos, etc. Puesto que los sistemas inmunológicos de todos los vertebrados actúan de forma similar, las aplicaciones descritas pueden aplicarse en todos los sistemas de vertebrados.

Se ofrecen los siguientes ejemplos para ilustrar diversas realizaciones de la invención, y no pretenden limitar la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

Protocolos

Ratones y cultivos celulares

Ratones engendrados por endogamia se mantuvieron en the University of Alabama en Birmingham. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 o DMEM que contenía suero bovino fetal al 2% y suero de ternera al 6%.

Aplicación tópica de los vectores genéticos

Los ratones se anestesiaron y se retiró el pelo y el epitelio cornificado que cubría un área restringida de la piel abdominal o del cuello mediante un cepillo o un depilador (por ejemplo, NAIR). Los vectores genéticos se pipetearon sobre la piel prerrasurada y se mantuvieron en contacto con la piel desnuda durante diversas cantidades de tiempo (por ejemplo, de 1 hora a 18 horas). Los vectores pueden pipetearse directamente sobre la piel desnuda, o hacia un cilindro que esté pegado a la piel.

Preparación de los vectores adenovíricos

Se prepararon cepas de adenovirus de alta titulación a partir de células 293 humanas infectadas con recombinantes adenovíricos específicos. Los lisados se sometieron a una ultracentrifugación a lo largo de un gradiente de cloruro de cesio. Las bandas víricas se extrajeron y se dializaron contra Tris 10 mM (pH 7,5)/NaCl 135 nM/KCl 5 mM/$MgCl_2$ 1 mM. Los virus purificados se esterilizaron mediante filtración con glicerol añadido hasta 10% y se conservaron en partes alícuotas a -80 ºC. Se determinó la titulación para las cepas de adenovirus mediante un ensayo en placa.

Ensayo de luciferasa

Se determinó la cantidad de luciferasa en la piel tal como se describió previamente (Tang, 1994). Brevemente, un trozo de la piel retirada se homogeneizó con un triturador de tejidos de vidrio Kontes en tampón de lisis. Después de

eliminar los restos de tejidos mediante centrifugación, se determinó la actividad luciferasa en el extracto de piel con un luminómetro mediante la medición de la emisión de luz integrada en presencia de un exceso de ATP y luciferina.

Ensayo de β-galactosidasa

Un trozo de piel retirada se congeló rápidamente en el compuesto Tissue-Tek O.C.T. (Miles Laboratories Inc.) en nitrógeno líquido y se conservó a -80 ºC hasta su uso. El tejido congelado se cortó en secciones transversales a 4 μm, se fijó en paraformaldehído al 4%, y se tiñó para la actividad β-galactosidasa mediante la incubación en una disolución de tinción X-gal según se ha descrito previamente (Tang *et al.*, 1994). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina y eosina.

Preparación de complejos de ADN/adenovirus

Los complejos de ADN/adenovirus se prepararon mezclando 100 μg de ADN plasmídico con 1 x 10^{11} partículas de adenovirus en presencia del agente condensante polilisina para cada aplicación. La titulación del adenovirus se determinó mediante la absorbancia.

Preparación de complejos de ADN/liposomas

Los complejos de ADN/liposomas se prepararon mezclando 100 μg de ADN plasmídico con 100 μg de DOTAP/DOPE (1:1, Avanti) para cada aplicación. Los plásmidos se prepararon utilizando kits Qiagen Plasmid Maxi.

Análisis de la transferencia Western

Sueros de sangrados de la cola se diluyeron de 1:250 a 1:500 y se hicieron reaccionar con proteínas purificadas que se habían separado en un gel de SDS-poliacrilamida y se trasladaron a una membranta Immobilon-P (Millipore). La reacción se visualizó utilizando el kit ECL (Amersham).

Ejemplo de referencia 1

La presente invención demuestra que pueden administrarse genes de antígenos a la piel de ratones de una manera simplificada mediante la administración no invasiva dirigida a la piel de un vector genético sin utilizar equipo sofisticado. La figura 1 demuestra que se produjeron cantidades sustanciales de la enzima luciferasa después de la administración de cantidades limitadas de AdCMV-luc (un vector adenovírico que codifica la luciferasa de luciérnaga) (Tang *et al.*, 1994) sobre la piel. Ad, adenovirus; pfu, unidades formadoras de placa; LU, unidades de luz. Los resultados son la media de log[LU por cm^2 de piel] ± EE (se muestra *n* en la parte superior de cada columna). Los ratones con aplicación fingida o revestidos con un vector adenovírico que no codifica luciferasa no produjeron actividad luciferasa detectable en la piel. El nivel de expresión del transgén desde el vector adenovírico en la piel no parece que se correlecione con la titulación del virus. Es posible que sólo un pequeño número de células pueda ser transducido por el virus en un subconjunto restringido de la piel, y 10^8 unidades formadoras de placa (pfu) de recombinantes adenovíricos pueden haber saturado las células diana. Esta variabilidad también puede ser debida, en parte, a variaciones en los ratones individuales. Además, una parte de la variabilidad probablemente surgiera del procedimiento de retirar el epitelio cornificado que no se había estandarizado (Johnston y Tang, 1994). La cantidad de antígeno producida puede ser amplificada potencialmente mediante la aplicación de más vectores sobre un área mayor.

Ejemplo de referencia 2

Las principales células diana para la vacunación no invasiva sobre la piel parecen ser células de la matriz capilar dentro de los folículos capilares (figura 2a) y los queratinocitos dentro de la capa más externa de la epidermis (figura 2b), según se demuestra mediante la tinción de secciones congeladas con sustratos X-gal después de la administración no invasiva dirigida a la piel de un vector adenovírico que codifica el gen de β-galactosidasa de *E. coli* (AdCMV-βgal) (Tang *et al.*, 1994). No se descubrieron abrasiones físicas en el tejido de la piel sometido al tratamiento, y no se indujo inflamación. El tejido de la piel sometido a la administración de genes no invasiva se retiró de los animales un días después de pipetear 10^8 pfu de AdCMV-βgal sobre la piel, se cortó en secciones transversales, se fijó y se tiñó con sustratos X-gal según se ha descrito (Tang *et al.*, 1994). La figura 2a muestra las células de la matriz capilar transducidas con adenovirus dentro del folículo capilar, x150. La figura 2b muestra queratinocitos transducidos con adenovirus dentro de la capa más externa de la epidermis, x150. No se encontraron células azules en los animales control, con aplicación fingida o revestidos con AdCMV-luc.

Ejemplo de referencia 3

Respuestas inmunológicas humorales provocadas por la NIVS mediada por adenovirus

La NIVS es un nuevo método para vacunar animales. Para demostrar que el procedimiento puede provocar una respuesta inmunológica específica contra el antígeno codificado por el vector, AdCMV-hcea (un vector adenovírico que codifica el antígeno carcinoembrionario humano (CEA)) se pipeteó sobre la piel de ratones de la raza C57BL/6. El suero de un ratón vacunado un mes después de la administración no invasiva dirigida a la piel de 10^8 pfu de

AdCMV-hcea se diluyó 1:500 y se hizo reaccionar con la proteína CEA humana purificada (proporcionada por T. Strong) y proteínas adenovíricas que se habían separado en un gel de SDS al 5%-poliacrilamida, y se trasladó a membranas Immobilon-P (Millipore). Haciendo referencia a la figura 3a: carril 1, 0,5 μg de CEA humana; carril 2, 0,5 μg de BSA; carril 3, 10^7 pfu de adenovirus. La figura 3a muestra que los sueros de ensayo de un animal vacunado reaccionan en análisis de la transferencia Western con la proteína CEA humana purificada, pero no con albúmina de suero bovina (BSA), lo cual apoya la conclusión de que se han producido anticuerpos específicos contra proteínas exógenas codificadas por vectores adenovíricos como resultado de la administración de genes no invasiva dirigida a la piel.

Para ensayar si esta técnica puede ser aplicable en general, se aplicó AdCMV-hgmcsf (un vector adenovírico que codifica el factor estimulante de colonicas de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF)) a la piel. Para detectar anticuerpos contra la proteína GM-CSF humana, el animal se vacunó mediante la administración no invasiva dirigida a la piel de 10^8 pfu de AdCMV-hgmcsf. La proteína GM-CSF humana purificada (CalBiochem) separada en un gel de SDS al 15%-poliacrilamida se trasladó a membranas y se dejó reaccionar con el suero diluido. Se realizaron otros tratamiento según se describe en la figura 3a. Haciendo referencia a la figura 3b: carril 1, 0,25 μg de GM-CSF humano; carril 2, 0,25 μg de BSA; carril 3, 10^7 pfu de adenovirus. El AdCMV-hgmcsf y AdCMV-hcea derivado del adenovirus humano defectuoso en la replicación de serotipo 5 fueron producidos en células 293 humanas. Un módulo que contenía el gen de CEA humano o el gen de GM-CSF humano, dirigido por el elemento potenciador-promotor temprano de citomegalovirus (CMV), se insertó en lugar de la deleción E1a. Puesto que las secuencias en la región E1a estaban delecionadas, se alteró la capacidad de estos virus para replicarse de forma autónoma en células no permisivas.

Los resultados (Tang *et al.*, 1997) demuestran que 96% (23/24) de los ratones de raza C57BL/6 producen anticuerpos contra la proteína CEA humana un mes después de la administración no invasiva dirigida a la piel de AdCMV-hcea, y 43% (6/14) de ratones de la misma cepa producen anticuerpos contra la proteína GM-CSF humana después de la administración no invasiva dirigida a la piel de AdCMV-hgmcsf. Ambos sueros preinmunológicos se recogieron antes de la NIVS, y los sueros procedentes de animales no expuestos no reaccionaron con las proteínas CEA y GM-CSF humanas. La posibilidad de una vacunación oral mediante la ingestión de los vectores a través del acicalamiento fue eliminada (1) enjuagando los vectores de la piel antes de que los animales se recuperasen de la anestesia, (2) pipeteando los vectores sobre la piel no rasurada, y (3) mezclando animales no expuestos y vacunados en la misma jaula. Nunca se observó vacunación cruzada entre los ratones no expuestos y vacunados, y el rasurado parece ser un componente fundamental para la NIVS, probablemente debido a la eliminación mecánica del epitelio cornificado a lo largo del recorrido del rasurado. Así, una NIVS mediada por adenovirus es capaz de provocar una respuesta inmunológica humoral contra un antígeno codificado por el vector.

Ejemplo de referencia 4

Para demostrar que las técnicas de la presente invención pueden producir una respuesta inmunológica antitumoral protectora se inocularon células tumorales singeneicas que expresan el gen del antígeno carcinoembrionario humano (CEA) (MC38-CEA-2) (Conry *et al.*, 1995) en ratones de la raza C57BL/6 no expuestos que habían sido vacunados mediante la aplicación tópica de un vector adenovírico que codifica el gen de CEA humano (AdCMV-hcea). Los animales sometidos a exposición a tumores se observaron para su supervivencia (figura 4). En el grupo control, 90% (9/10) de los animales desarrollaron nódulos tumorales palpables y murieron a los 30 días después de la implantación de las células tumorales. En el grupo vacunado, sólo 10% (1/10) de los animales murieron, y 70% (7/10) permanecieron totalmente exentos de tumores. Los ratones se sometieron a eutanasia cuando el tumor alcanzó un diámetro mayor que 1 cm. El intervalo entre la inyección de las células tumorales y la eutanasia se utiliza como el tiempo de supervivencia del individuo. Haciendo referencia a la figura 4, ratones control (no les administraron vacunas) y animales inmunizados con NIVS (se habían aplicado 10^8 pfu de AdCMV-hcea por vía tópica un mes antes) se sometieron a una exposición a tumores. Los números entre paréntesis representan el número de animales para cada tratamiento. Los resultados demuestran que la administración no invasiva de vacunas genéticas a la piel puede ser capaz de producir respuestas inmunológicas protectoras contra células tumorales que expresan un antígeno específico.

Ejemplo de referencia 5

Construcción de vectores adenovíricos recombinantes que codifican genes de citoquinas y coestimulatorios

Se construyeron vectores adenovíricos que codifican genes de citoquinas y coestimulatorios para la coadministración de estos genes inmunomoduladores con genes de antígenos en células de la piel para intentar dirigir el perfil inmunológico en animales vacunados. Se construyó el vector adenovírico AdCMV-mB7.1 que codifica el gen de B7-1 murino y el vector adenovírico AdCMV-mgmcsf que codifica el gen de GM-CSF murino mediante recombinación homóloga entre dos plásmidos transfectados en células 293 humanas siguiendo un procedimiento convencional para generar nuevos vectores adenovíricos (Gómez-Foix *et al.*, 1992). Todos los transgenes en estos vectores estaban transcripcionalmente dirigidos por el elemento potenciador-promotor temprano de CMV. AdCMV-mB7.1 se caracteriza mediante la tinción de células SCC-5 de carcinoma pulmonar humanas transducidas, con el anticuerpo anti-CD80 (PharMingen), seguido de un análisis mediante citometría de flujo. AdCMV-mgmcsf se caracterizó midiendo el GM-CSF murino segregado de las células SCC-5 transducidas con un kit ELISA

(Amersham).

Ejemplo de referencia 6

Detección de la inmunidad antitumoral mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo*

Se desarrolló un ensayo de citotoxicidad *in vivo* en el que las células diana se implantaron como monocapas sobre el tejido muscular de ratones (Tang *et al.*, 1996). La implantación de células diana como monocapas permitió una recolección eficaz de células diana para evaluar su situación después de unos pocos días de crecimiento *in vivo*. Este ensayo fue particularmente útil para detectar respuestas inmunológicas débiles que no son lo suficientemente potentes para erradicar las células diana. Las respuestas inmunológicas pueden caracterizarse mediante el análisis histológico del lecho de implantación. Sin una respuesta inmunológica, las células diana crecerán. Con una potente respuesta inmunológica, las células diana se erradicarían en presencia de un gran número de células efectoras inmunológicas en el lecho de implantación, probablemente debido a la migración hacia las células diana en crecimiento y la sensibilización *in situ* alrededor de estas. Con una respuesta inmunológica débil, las células diana en crecimiento se mezclarían con las células efectoras inmunológicas infiltrantes en el lecho de implantación. La implantación de 5 x 10^5 células RMI-luc (células de tumor de próstata RMI que expresan el gen de la luciferasa) como una monocapa en ratones C57BL/6 no expuestos produjo una capa tumoral debido a la proliferación de las células RMI-luc *in vivo*, sin evidencias de intervención inmunológica. En contraste con los animales control, las células RMI-luc se mezclaron con un gran número de células efectoras inmunológicas en el lecho de implantación en animales vacunados mediante la administración no invasiva dirigida a la piel de AdCMV-luc.

Ejemplo de referencia 7

Caracterización de las células efectoras inmunológicas reclutadas por las células tumorales

El ensayo citotóxico *in vivo* fue capaz de concentrar un gran número de células efectoras inmunológicas en el lecho de implantación mediante la implantación de un pequeño número de células diana como una monocapa sobre el músculo. La caracterización de células efectoras inmunológicas específicas en el lecho de implantación puede proporcionar pruebas para saber si una respuesta inmunológica mediada por células ha sido provocada para destruir a las células diana. Para caracterizar a las células T que habían sido reclutadas por las células tumorales que expresan luciferasa en animales vacunados mediante la administración no invasiva dirigida a la piel de AdCMV-luc, se tiñeron secciones de tejido del lecho de implantación con un anticuerpo monoclonal anti-CD3 (mAb). Las células RMI-luc se produjeron lipofectando ADN de pHBA-luc en células de tumor prostático RMI (proporcionadas por T. Thompson del Baylor College of Medicine), seguido de la selección en un medio que contenía G418. Los clones que expresaban luciferasa se caracterizaron mediante un ensayo de luciferasa. Se implantaron 5 x 10^5 células RMI-luc como una monocapa en un ratón que había sido vacunado mediante la administración no invasiva dirigida a la piel de 10^8 pfu de AdCMV-luc. Cinco días después de la implantación, el lecho de la implantación se congeló en O.C.T. y se cortaron secciones a 4 μm, se secaron en acetona al 100%, y se tiñeron con un mAb anti-CD3 (clon F500A2, proporcionado por P. Buey de la UAB), a través del procedimiento de ABC inmunoperoxidasa con diaminobencidina como cromógeno.

Tal como se muestra en la figura 5, un gran número de células T se infiltraron en el lecho de implantación después de 5 días de crecimiento *in vivo* de células RMI-luc en un ratón vacunado mediante la administración no invasiva dirigida a la piel de AdCMV-luc (x150), mientras que sólo se encontraron unas pocas células T en animales no expuestos. Parece que el mismo número de células diana RMI-luc puede reclutar más linfocitos T hacia el lecho de implantación en animales vacunados que en animales no expuestos.

Para caracterizar los CTL que fueron reclutados por las células diana, se sometieron secciones congeladas del lecho de implantación a una hibridación *in situ* utilizando una molécula de ARN de granzima A antisentido como sonda. Se implantaron 5 x 10^5 células RMI-luc como una monocapa en un ratón C57BL/6 no expuesto que había sido vacunado mediante una administración no invasiva dirigida a la piel con 10^8 pfu de AdCMV-luc. Cinco días después de la implantación, el lecho de implantación se congeló en O.C.T. y se cortaron secciones a 4 μm. Las secciones congeladas se fijaron en paraformaldehído al 3%, se incubaron en HCl 0,2 M para inhibir la actividad fosfatasa alcalina endógena, y se hibridaron con una sonda de ARN de granzima A antisentido termodesnaturalizada. Las sondas para la hibridación *in situ* fueron moléculas de ARN monocatenarias producidas mediante transcripción a partir de un plásmido que contenía promotores de bacteriófagos. Durante la transcripción, se incorporó digoxigenina UTP directamente a la secuencia. Se emplearon sondas de secuencias sentido como controles negativos. Después de la hibridación con las sodas, las secciones se lavaron y se incubaron con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, seguido de una incubación en la disolución de sustrato enzimático NBT/BCIP.

Los CTL que expresan la granzima A son CTL activados y se han utilizado como marcadores predictivos para el rechazo de tejidos durante el transplante. Se encontraron CTL granzima-positivos dentro del lecho de implantación de RMI-luc sólo en los animales que había sido vacunados mediante una administración no invasiva dirigida a la piel con AdCMV-luc (figura 6). Su presencia en el lecho sugiere que la NIVS ha podido inducir una respuesta inmunológica mediada por células contra las células tumorales que expresan un antígeno específico.

Ejemplo de referencia 8

Aplicación tópica de vacunas genéticas mediante vendas adhesivas

Se demostró, por primera vez, que pueden utilizarse vendas para la administración de vacunas. Este desarrollo puede permitir que personal sin formación médica pueda administrar una dosis uniforme de vacunas no invasivas sobre la piel. Para transducir la piel con vendas, se pipetearon 50 μl del vector AdCMV-luc descrito en el ejemplo 7 en la almohadilla de una venda adhesiva (Johnson & Johnson). La venda que contenía el vector después se adhirió a la piel prerrasurada de un ratón. El vector se mantuvo en contacto con la piel desnuda durante 18 horas. Para detectar la expresión de transgenes desde los vectores genéticos administrados mediante la venda, la piel se ensayó para la luciferasa (tabla 1). Aunque los resultados muestran una variación sustancial, pudo lograrse la expresión de transgenes en la piel utilizando vendas adhesivas.

Para demostrar que los animales pueden vacunarse con vendas adhesivas no invasivas se ensayó suero de sangrados de la cola para anticuerpos anti-CEA dos meses después de adherir las vendas que contenían AdCMV-hcea sobre la piel de ratones. Tal como se muestra en la figura 7, se detectaron anticuerpos anti-CEA en 100% (10/10) de los ratones que recibieron vacunas no invasivas a través de vendas adhesivas.

Ejemplo de referencia 9

NIVS mediada por ADN/adenovirus

Puede hacerse que los vectores basados en adenovirus sean más versátiles uniendo ADN plasmídico al exterior de un adenovirus. El sistema de vector resultante media en la administración de genes de alta eficacia en una amplia variedad de células diana. Esta estrategia permite una flexibilidad muy potenciada en términos del tamaño y del diseño de los genes extraños. Por tanto, los complejos de ADN/adenovirus pueden administrar genes de antígenos sobre la piel a través de la misma vía de endocitosis mediada por receptores de adenovirus con más flexibilidad.

Para demostrar la viabilidad de la NIVS mediada por ADN/adenovirus, se dejó que ADN plasmídico que codificaba la hormona de crecimiento humana (pCMV-GH) (Tang *et al.*, 1992) se complejase con un adenovirus defectuoso en E4. Se vacunaron ratones (cepa C57BL/6) poniendo en contacto complejos de ADN/adenovirus con la piel desnuda durante un día. Los animales inmunizados después se controlaron para la producción de anticuerpos contra la proteína de la hormona del crecimiento humana (hGH) analizando suero de sangrados de la cola. Tal como se muestra en la figura 8a, carril 1, hGH (0,5 μg), y carril 2, BSA (0,5 μG), el suero de ensayo reaccionó en análisis de la transferencia Western con la hGH purificada, pero no con proteínas irrelevantes. De los diez ratones vacunados con complejos de ADN/adenovirus, ocho (80%) produjeron anticuerpos contra hGH en tres meses, lo cual indica que pueden producir anticuerpos específicos contra proteínas exógenas codificadas por ADN plasmídico que está complejado con adenovirus y que se ha administrado de un modo no invasivo. El suero preinmunológico recogido antes del tratamiento, el suero de animales no tratados, y el suero de animales vacunados con vectores irrelevantes no reaccionaron con la hGH. Por tanto, los complejos de ADN/adenovirus, al igual que los recombinantes adenovíricos, parecen ser un sistema de vector legítimo para la NIVS.

Ejemplo de referencia 10

NIVS mediada por ADN/liposomas

Además del desarrollo de vectores genéticos que implican a adenovirus como vehículos para vacunas no invasivas, también se ha demostrado que pueden vacunarse ratones mediante la aplicación tópica de complejos de ADN/liposomas sin elementos víricos. Es evidente que pueden aplicarse muchos vectores de una manera creativa para la administración de vacunas no invasivas dirigidas a la piel. Tal como se muestra en la figura 8b, carril 1, hGH (0,5 μg), y carril 2, BSA (0,5 μG), el suero de ensayo procedente de un ratón inmunizado mediante la aplicación tópica de complejos de ADN/liposomas que codifican hGH reacciona con hGH pero no con BSA. De los 10 ratones vacunados con los complejos de ADN/liposomas, los sueros de ensayo reaccionaron con hGH purificada en 9 (90%) animales tratados a los 5 meses. Así, los complejos de ADN/liposomas, al igual que los adenovirus y los complejos de ADN/adenovirus, parecen ser un sistema de vector legítimo para la NIVS.

Ejemplo de referencia 11

Coexpresión de transgenes codificados por ADN y codificados por adenovirus

Las estrategias para aumentar la respuesta del sistema inmunológico pueden mejorar potencialmente los resultados clínicos de las vacunas. La producción local de moléculas inmunomoduladoras implicadas en la activación y la expansión de poblaciones de linfocitos puede mejorar significativamente los efectos de la vacunación. Se han fabricado vectores adenovíricos que codifican los genes de GM-CSF y B7-1 murinos. Por tanto, la aplicación tópica de complejos de ADN/adenovirus puede ser capaz de coexpresar moléculas inmunomoduladoras o antígenos codificados por ADN, con moléculas inmunomoduladoras o antígenos codificados por adenovirus en células dérmicas individuales para potenciar la respuesta inmunológica contra el antígeno.

La figura 9 demuestra que la expresión de transgenes a partir de ADN plasmídico en células diana depende de la presencia de adenovirus, permitiendo así que los transgenes codificados por plásmidos y codificados por adenovirus

sean coexpresados en la misma célula. Se mezcló el ADN del plásmido pVR-1216 (proporcionado por Vical), partículas de AdCMV-βgal y polilisina en proporciones específicas tal como se muestra en la figura. El complejo se aplicó a 2 x 10^5 células SCC-5 en un pocillo y se incubó durante 2 horas. El complejo entonces se retiró y las células se recolectaron para los ensayos de luciferasa y β-galactosidasa al día siguiente. Columna blanca: actividad luciferasa; columna rayada: actividad β-galactosidasa. Los resultados demuestran que los transgenes codificados por ADN no se expresan en las células diana en ausencia del adenovirus, mientras que los transgenes codificados por adenovirus pueden expresarse en presencia de ADN. También es posible que el ADN pueda condensarse sobre la superficie de otros virus para dirigirse a diferentes tipos celulares. Por consiguiente, este protocolo proporciona un sistema de administración de genes simple pero versátil que permite la expresión de manera simultánea de transgenes de un recombinante vírico y de un plásmido unido externamente.

Ejemplo de referencia 12

Expresión de transgenes relativa en la piel desde diferentes vectores genéticos mediante la aplicación tópica

Se ha demostrado que recombinantes adenovíricos, complejos de ADN/adenovirus, complejos de ADN/liposomas, y quizás muchos otros vectores genéticos pueden aplicarse como vehículos para vacunas no invasivas. Puede pensarse que cuanto mayor sea la eficacia para la expresión de transgenes, más poderoso será el vehículo. Para definir las eficacias relativas de los vectores utilizados, se dejó que recombinantes adenovíricos, complejos de ADN/adenovirus, o complejos de ADN/liposomas se pusieran en contacto con la piel de un ratón mediante una aplicación tópica durante 18 hr. La piel tratada después se retiró del animal y se ensayó para la actividad luciferasa con un luminómetro midiendo la emisión de luz integrada durante 2 min utilizando el sistema de ensayo de luciferasa de Promega, y el fondo se restó de las lecturas. Tal como se muestra en la figura 10, se descubrió que los recombinantes adenovíricos eran el sistema de vector más eficaz para la administración de genes no invasiva dirigida a la piel. Los ratones tratados de modo simulado no produjeron actividad luciferasa detectable en la piel. LU, unidades lumínicas; Ad, AdCMV-luc; ADN/Ad, ADN de pVR-1216 complejado con Ad dl1014; ADN/liposomas, ADN de pVR-1216 complejado con DOTAP/DOPE. Los resultados son la media del log(LU por cm^2 de piel) ± EE (se muestra *n* en la parte superior de cada columna). Aunque la eficacia del complejo de ADN/adenovirus es menor que la del recombinante adenovírico, es significativamente mayor que la del complejo de ADN/liposomas. Además, el adenovirus puede inactivarse mediante irradiación de rayos gamma o UV antes de formar un complejo con el ADN para evitar que las partículas víricas viables se diseminen. Por tanto, podría parecer que los complejos de ADN/adenovirus sean el sistema vehículo más prometedor para la administración de vacunas no invasivas cuando se consideran factores de eficacia y seguridad en la formulación de una nueva generación de vacunas.

Ejemplo 13

Construcción de un vector de expresión que codifica antígenos de la gripe

Se construyó un recombinante adenovírico defectuoso en E1/E3 que codifica el gen de HA A/PR/8/34 (AdCMV-PR8.ha) según se ha descrito (Gómez-Foix *et al.*, 1992). Brevemente, un fragmento BamHI de 1,8 kb que contenía la secuencia codificadora completa de HA se cortó del plásmido pDP122B [American Type Culture Collection (ATCC)] y después se insertó en el sitio BamHI de pACCMV.PLPA en la orientación correcta bajo el control transcripcional del promotor temprano de citomegalovirus (CMV) humano. El plásmido resultante que codifica HA se cotransfectó con el plásmido pJM17 en células 293 humanas para generar recombinantes adenovíricos defectuosos en E1/E3. Se construyó un recombinante adenovírico defectuoso en E1/E3 que codifica el gen de la proteína nuclear (NP) A/PR/8/34 (AdCMV-PR8.np) clonando el gen NP (proporcionado por Merck) en pACCMV.PLPA, seguido de la recombinación homóloga en células 293 según se describió anteriormente.

Se construyó un vector de expresión plasmídico que codifica HA (pCMV-PR8.ha) y otro que codifica NP (pCMV-PR8.np) clonando los genes de HA y NP en pVR1012 (proporcionado por Vical), respectivamente.

Ejemplo 14

Anticuerpos anti-gripe generados mediante la aplicación tópica y la inoculación intranasal de vacunas basadas en adenovirus en ratones

Tal como se muestra en la figura 12, ratones BALB/c (de 3 semanas) se inmunizaron mediante una diversidad de modalidades de vacunación, incluyendo la inyección intramuscular de ADN, la inoculación intranasal de vectores adenovíricos, y la aplicación tópica de un parche de vacuna basada en adenovirus. Se realizó una vacunación no invasiva dirigida a la piel pipeteando vectores adenovíricos sobre la piel abdominal prerrasurada, seguido de la extensión del vector como una película fina sobre la piel desnuda con un trozo del parche Tegaderm (3M). Los vectores no absorbidos se lavaron en una hora. Todos los animales se inmunizaron 3 veces cada 3 semanas. Se ensayaron muestras de suero para detectar anticuerpos anti-gripe 1 semana después del último refuerzo. Se determinaron las titulaciones de IgG anti-gripe mediante ELISA como se describe (12) utilizando el virus A/PR/8/34 purificado como antígeno de captura. Las muestras de suero e IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Promega) se incubaron secuencialmente sobre las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con un lavado a fondo entre cada incubación. El criterio de valoración se calculó como la dilución de suero que produce la misma

DO_{450} que una dilución 1/100 del suero preinmunológico. Al suero negativo a la menor dilución ensayada se le asignaron unas titulaciones de criterio de valoración de 100. El suero postinmunológico también reacciona con un antígeno control (por ejemplo, BSA) a un nivel bajo. Se realizó el ensayo de inhibición de hemaglutinina (HI) para medir la capacidad de los anticuerpos anti-HA para inhibir la aglutinación de eritrocitos (RBC) por los virus, quizás mediante el bloqueo de la unión a la superficie celular. Se diluyeron muestras de suero preabsorbidas con RBC de pollo y se mezclaron con 4 unidades de HA de virus de la gripe A/PR/8/34. Entonces se añadieron los RBC de pollo hasta una concentración final del 0,5%. La aglutinación se determinó mediante un examen visual. La titulación se definió como la dilución que es el límite de inhibición. Todos los sueros preinmunológicos tenían una titulación ≤ 20. Grupo 1, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de adenovirus de tipo salvaje de serotipo 5, seguido de una aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.ha y 10^8 pfu de AdCMV-PR8.np dos semanas después (n = 9); grupo 2, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de adenovirus de tipo salvaje de serotipo 5, seguido de una inyección intramuscular de 100 μg de ADN de pCMV-PR8.ha y 100 μg de ADN de pCMV-PR8.np dos semanas después (n = 10); grupo 3, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de adenovirus de tipo salvaje de serotipo 5, seguido de una inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.ha y 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.np dos semanas después (n = 8); grupo 4, aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.ha y 10^8 pfu de AdCMV-PR8.np (n = 10); grupo 5, aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.np (n = 10); grupo 6, aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.ha (n = 10); grupo 7, inyección intramuscular de 100 μg de ADN de pCMV-PR8.ha y 100 μg de ADN de pCMV-PR8.np (n = 10); grupo 8, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.ha y 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.np (n = 9). Los datos se representaron gráficamente como la media geométrica de las titulaciones de criterio de valoración. En el grupo control sin exposición (n = 7) no se detectaron anticuerpos anti-gripe. Se utilizó la estrategia del análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las diferencias en las titulaciones de HI y ELISA. Se realizaron comparaciones apareadas múltiples con el procedimiento de Tukey ajustándose el nivel alfa global a 0,05. Los análisis se realizaron a escala logarítmica de las mediciones para cumplir la suposición de varianza constante requerida por la estrategia ANOVA. Las diferencias en las titulaciones de HI y ELISA entre los 8 grupos fueron significativas ($P < 0,0001$). La titulación de ELISA en el grupo 8 fue significativamente mayor que en los otros grupos ($P < 0,02$). La titulación media de ELISA en el grupo 1 fue la más baja, pero no era significativamente diferente de la del grupo 5 o 6. La titulación de HI en el grupo 8 fue la mayor, y la del grupo 3 la segunda mayor. Los valores de la titulación de HI en los grupos 1, 2, 4, 5 y 6 no fueron significativamente diferentes.

Ejemplo 15

Protección de los ratones frente a la muerte tras una exposición a virus

Tal como se muestra en la figura 13, ratones BALB/c (3 semanas) se inmunizaron mediante una diversidad de modalidades de vacunación, incluyendo la inyección intramuscular de ADN, la inoculación intranasal de vectores adenovíricos, y la aplicación tópica de un parche de vacuna basada en adenovirus. Se realizó una vacunación no invasiva dirigida a la piel pipeteando vectores adenovíricos sobre la piel abdominal prerrasurada, seguido de la extensión del vector como una película fina sobre la piel desnuda con un trozo del parche Tegaderm (3M). Los vectores no absorbidos se lavaron en una hora. Todos los animales se inmunizaron 3 veces cada 3 semanas. Una semana antes del último refuerzo, los ratones se expusieron por vía intranasal a una dosis letal de virus de la gripe A/PR/8/34 (1.000 unidades de HA) y se controlaron a diario para la supervivencia. Los datos se representaron gráficamente como el porcentaje de supervivencia frente a los días después de la exposición. Control no expuesto, ratones no expuestos a adenovirus; grupo 1, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de adenovirus de tipo salvaje de serotipo 5, seguido de una aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.ha y 10^8 pfu de AdCMV-PR8.np dos semanas después; grupo 2, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de adenovirus de tipo salvaje de serotipo 5, seguido de una inyección intramuscular de 100 μg de ADN de pCMV-PR8.ha y 100 μg de ADN de pCMV-PR8.np dos semanas después; grupo 3, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de adenovirus de tipo salvaje de serotipo 5, seguido de una inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.ha y 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.np dos semanas después; grupo 4, aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.ha y 10^8 pfu de AdCMV-PR8.np; grupo 5, aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.np; grupo 6, aplicación tópica de 10^8 pfu de AdCMV-PR8.ha; grupo 7, inyección intramuscular de 100 μg de ADN de pCMV-PR8.ha y 100 μg de ADN de pCMV-PR8.np; grupo 8, inoculación intranasal de 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.ha y 2,5 x 10^7 pfu de AdCMV-PR8.np. AdCMV-PR8.ha, un vector adenovírico que codifica la hemaglutinina de A/PR/8/34; AdCMV-PR8.np, un vector adenovírico que codifica la proteína nuclear de A/PR/8/34; pCMV-PR8.ha, un vector de expresión plasmídico que codifica la hemaglutinina de A/PR/8/34; pCMV-PR8.np, un vector de expresión plasmídico que codifica la proteína nuclear de A/PR/8/34. Los números entre paréntesis representan el número de animales para cada tratamiento.

La preexposición a adenovirus de tipo salvaje no intervino en este modo de vacunación. Tal como se muestra en el informe final de la fase I, pueden provocarse unos niveles altos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la gripe A/PR/8/34 mediante la inoculación intranasal de estos vectores incluso en animales con una preexposición al adenovirus. Los resultados sugieren que la protección puede estar mediada principalmente por una respuesta inmunológica humoral cuando los animales se inmunizan mediante inoculación intranasal de recombinantes adenovíricos. En contraste con la vía intranasal, los animales inmunizados mediante la aplicación tópica de AdCMV-PR8.ha y AdCMV-PR8.np adquirieron una protección del 71% frente a la exposición. Sin embargo, los animales con una preexposición al adenovirus no fueron protegidos por la NIVS (vacunación no invasiva sobre la piel). Tal como se muestra en el informe final de la fase I, los animales inmunizados mediante NIVS produjeron un nivel

relativamente bajo de anticuerpos neutralizantes frente al virus de gripe A/PR/8/34. Al igual que los anticuerpos inducidos por las vacunas intranasales, la producción de anticuerpos anti-gripe, provocada por la NIVS, no fue intervenida por la preexposición al adenovirus. Los resultados sugieren que la inmunidad protectora puede ser mediada por una respuesta inmunológica celular cuando los animales se inmunizan mediante NIVS, y este mecanismo inmunológico puede ser suprimido por la inmunidad preexistente al vector. Para los pacientes que pueden recibir vacunas intranasales sin complicaciones debidas a problemas respiratorios, puede por tanto ser apropiado coadministrar vacunas epicutáneas basadas en adenovirus junto con sus homólogos intranasales para intentar activar ambas secciones del sistema inmunólogico de modo simultáneo. También existe una necesidad urgente de desarrollar un vehículo de vacuna no inmunogénico para la NIVS para vacunar a animales con una inmunidad preexistente al adenovirus.

Ejemplo de referencia 16

Producción de anticuerpos anti-HA en macacos cola de cerdo mediante NIVS

Aunque la NIVS puede provocar, de modo reproducible, respuestas inmunológicas sistémicas en ratones (figuras 12 y 13), puede no ser posible que la NIVS inmunice a seres humanos si es necesario que se produzca la difusión transdérmica de los vectores para que se produzca la vacunación, porque la piel humana es más gruesa que su homóloga murina. Sin embargo, los parches de vacunas no invasivas pueden inmunizar a seres humanos u otros animales con piel gruesa si sólo se requiere una ola transitoria pero productiva de expresión del antígeno en las células que están dentro de la capa externa de la piel. Para abordar estas cuestiones, los inventores inmunizaron un macaco cola de cerdo con AdCMV-PR8.ha de un modo no invasivo. Tal como se muestra en la figura 14, el animal inmunizado produjo anticuerpos contra HA en 4 semanas. El resultado proporciona pruebas de que los parches de vacuna no invasivos pueden inmunizar muchas especies diferentes además de los ratones.

En la figura 14, un macaco cola de cerdo se inmunizó de un modo no invasivo pipeteando 10^{10} pfu de AdCMV-PR8.ha sobre piel abdominal prerrasurada, seguido de la extensión del vector como una película fina sobre la piel desnuda con un parche Tegaderm (3M). Los vectores no absorbidos se lavaron en 5 horas. Se ensayaron muestras de suero para detectar anticuerpos anti-HA a las 4 semanas después de la inoculación. Se determinaron las titulaciones de IgG anti-HA mediante ELISA utilizando el virus A/PR/8/34 purificado como antígeno de captura. Las muestras de suero e IgG anti-mono de cabra conjugada con peroxidasa (Bethyl Laboratories, Inc.) se incubaron secuencialmente sobre las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con un lavado a fondo entre cada incubación. El criterio de valoración se calculó como la dilución de suero que produce la misma DO_{450} que una dilución 1/100 de suero preinmunológico. Al suero negativo a la menor dilución ensayada se le asignaron unas titulaciones de criterio de valoración de 1.

Ejemplo de referencia 17

Traslado de manchas de luciferasa en la piel después de la administración de genes localizada de un modo no invasivo

Para intentar determinar si los genes de antígenos administrados sobre la superficie de la piel pueden difundirse hacia tejidos más profundos y expresar los antígenos en la células por debajo de la epidermis, los inventores incubaron piel del cuello con AdCMV-luc (un vector adenovírico que codifica la luciferasa) (Tang *et al.*, 1997). Tal como se muestra en la figura 15, la actividad luciferasa puede detectarse en las orejas (o como manchas de luciferasa discretas en otras áreas dentro de la piel) en alguno de los animales tratados un día después de la administración no invasiva de AdCMV-luc sobre la piel del cuello. La luciferasa resultó indetectable en cualquiera de los órganos internos, incluyendo los nódulos linfáticos, el hígado, el bazo, el corazón, el pulmón y el riñón.

En la figura 15, se incubaron 1 x 10^8 pfu de AdCMV-luc con piel del cuello durante una hora. La piel del cuello, al igual que las orejas, se recogió para el ensayo de luciferas según se ha descrito (Tang *et al.*, 1994) un día después de la inoculación. Los números representan unidades de luz habiéndose restado el fondo de las lecturas.

En otro intento de identificar y caracterizar las células diana que son capaces de expresar el transgén a partir de un vector adenovírico aplicado por vía tópica, y las células móviles putativas que contienen la proteína expresada a partir del transgén, los inventores tiñeron secciones de piel con X-gal después de la aplicación tópica de AdCMV-βgal (un vector adenovírico que codifica β-galactosidasa) (Tang *et al.*, 1994). Estudiando secciones histológicas en busca de células de color azul oscuro, los inventores identificaron células de la matriz capilar marcadas dentro de los folículos capilares y queratinocitos marcados en la capa más externa de la epidermis como células diana principales para la transducción mediada por adenovirus cuando el vector se inocula de un modo no invasivo (las fotografías están disponibles a petición). Ninguno de los fibroblastos dérmicos fue transducido mediante este procedimiento, aunque estas células son altamente transducibles cuando se inyecta AdCMV-βgal por vía intradérmica utilizando una aguja (las fotografías están disponibles a petición). Los resultados sugieren que pocas o ninguna partícula adenovírica aplicada por vía tópica pudo penetrar en la dermis más allá de la capa externa de la epidermis. El examen microscópico de las secciones histológicas no reveló abrasiones físicas de la piel transducida. A nivel macroscópico, no se observó inflamación asociada con la piel tratada. Sin embargo, las células transducidas sólo podían visualizarse dentro del área de inoculación (por ejemplo, la piel del cuello). Los inventores no fueron capaces

de identificar células de color azul oscuro en las orejas ni en otras áreas dentro de la piel cuando pudo detectarse actividad luciferasa en estas áreas (figura 4), probablemente debido a que el ensayo de luciferasa es más sensible que el ensayo de β-galactosidasa mediado por X-gal. Los inventores han establecido la hipótesis de que algunas células que presentan antígenos (APC) pueden responder a antígenos expresados sobre la superficie de la piel mediante la adquisición del antígeno. La proteína puede degradarse con rapidez, y así es indectable en los órganos internos, incluyendo los nódulos linfáticos. La importancia biológica de este traslado de antígenos dentro de la piel es desconocida.

Ejemplo de referencia 18

Amplificación de ADN extraño en diversos tejidos después de la administración de genes localizada de un modo no invasivo

Para intentar determinar si la aplicación tópica de un vector adenovírico también puede administrar ADN exógeno más allá del área de inoculación se extrajo ADN de diversos tejidos, seguido de una amplificación del transgén, así como del gen de fibra de adenovirus de tipo 5 mediante PCR después de la administración no invasiva de AdCMV-PR8.ha sobre la piel. Tal como se muestra en la figura 16, los genes de fibra y de HA de longitud completa pueden amplificarse a partir de la piel 3 horas después de la inoculación. Normalmente el gen de longitud completa resulta indectable en el ADN de la piel después de 1 día, o en ADN extraído de otros tejidos. Sin embargo, pudieron amplificarse subfragmentos de los genes de HA y de fibra procedentes del hígado, sangre completa, oreja, piel abdominal, o nódulos linfáticos reunidos utilizando diferentes conjuntos de cebadores. No se detectó ADN extraño en ninguno de los tejidos 4 semanas después de la inoculación. Los resultados sugieren que la aplicación tópica de un vector adenovírico podría administrar ADN exógeno en un área localizada de la piel, aunque el ADN extraño puede ser adquirido con rapidez por algunas células presentadoras de antígenos putativas, degradarse y trasladarse a tejidos profundos. La eliminación del ADN extraño en 4 semanas enfatiza la seguridad de la NIVS. En la figura 16, se inocularon AdCMV-PR8.ha y AdCMV-luc en la piel prerrasurada de un modo no invasivo. El ADN se extrajo mediante DNAZOL (GIBCO BRL) y se amplificó con el siguiente conjunto de cebadores:

Ha5.1: 5'-A T G A A G G C A A A C C T A C T G G T-3' (SEQ ID NO:1)

Ha3.1: 5'-G A T G C A T A T T C T G C A C T G C A-3' (SEQ ID NO:2)

Ha5.2: 5'-G T G G G G T A T T C A T C A C C C G T-3' (SEQ ID NO:3)

Ha3.2: 5'-T G C A T A G C C T G A T C C C T G T T-3' (SEQ ID NO:4)

Luc5.1: 5'-G C G C C A T T C T A T C C T C T A G A-3' (SEQ ID NO:5)

Luc3.1: 5'-A C A A T T T G G A C T T T C C G C C C-3' (SEQ ID NO:6)

Luc5.2: 5'-G T A C C A G A G T C C T T T G A T C G-3' (SEQ ID NO:7)

Luc3.2: 5'-C C C T C G G G T G T A A T C A G A A T-3' (SEQ ID NO:8)

Fb5.1: 5'-C C G T C T G A A G A T A C C T T C A A-3' (SEQ ID NO:9)

Fb3.1: 5'-A C C A G T C C C A T G A A A A T G A C-3' (SEQ ID NO:10)

Fb5.2: 5'-G G C T C C T T T G C A T G T A A C A G-3' (SEQ ID NO:11)

Fb3.2: 5'-C C T A C T G T A A T G G C A C C T G T-3' (SEQ ID NO:12)

Ha5.1 y Ha3.1 amplificaron el gen de HA de 1,7 kg de longitud casi completa; Ha5.2 y Ha3.2 amplificaron un subfragmento de 0,6 kb que incluye 33% del gen de HA; Luc5.1 y Luc3.1 amplificaron el gen de luciferasa de 1,7 kb de longitud casi completa; Luc5.2 y Luc3.2 amplificaron un subfragmento de 0,52 kb que incluye 30% del gen de luciferasa; Fb5.1 y Fb3.1 amplificaron el gen de fibra de adenovirus de tipo 5 de 1,7 kg de longitud casi completa; Fb5.2 y Fb3.2 amplificaron un subfragmento de 0,55 kb que incluye 32% del gen de fibra. Carril M, marcador de peso molecular (ADN lamdba roto con HindIII); carril 1, el gen de luciferasa de longitud casi completa amplificado por Luc5.1 y Luc3.1 a partir de ADN de la piel 3 horas después de la NIVS; carril 2, el gen de luciferasa de longitud casi completa amplificado por Luc5.1 y Luc3.1 a partir de ADN de la piel 1 día después de la NIVS; carril 3, un subfragmento de ADN de luciferasa amplificado por Luc5.2 y Luc3.2 a partir de ADN de oreja de ratón 1 día después de la NIVS; carril 4, un subfragmento de ADN de luciferasa amplificado por Luc5.2 y Luc3.2 a partir de ADN de nódulo linfático 1 día después de la NIVS; carril 5, un subfragmento de ADN de luciferasa amplificado por Luc5.2 y Luc3.2 a partir de ADN de hígado 1 día después de la NIVS; carril 6, un subfragmento de ADN de luciferasa amplificado por Luc5.2 y Luc3.2 a partir de ADN extraído de sangre completa 1 día después de la NIVS; carril 7, el gen de HA de longitud casi completa amplificado por Ha5.1 y Ha3.1 a partir de ADN de la piel 3 horas después de la NIVS; carril 8, un subfragmento del gen de HA amplificado por Ha5.2 y Luc3.2 a partir de ADN de la piel 1 día después de la NIVS; carril 9, un subfragmento del gen de HA amplificado por Ha5.2 y Ha3.2 a partir de ADN de nódulo linfático 1 día después de la NIVS; carril 10, un subfragmento del gen de HA amplificado por Ha5.2 y Ha3.2 a partir de ADN de hígado 1 día después de la NIVS; carril 11, un subfragmento del gen de HA amplificado por Ha5.2 y Ha3.2 a partir de ADN de riñón 1 día después de la NIVS; carril 12, un subfragmento del gen de HA amplificado por Ha5.2 y Ha3.2 a partir de ADN extraído de sangre completa 1 día después de la NIVS; carril 13, el gen de fibra de longitud casi completa amplificado por Fb5.1 y Fb3.1 a partir de ADN de la piel 3 horas después de la NIVS; carril 14, el gen de fibra de longitud casi completa amplificado por Fb5.1 y Fb3.1 a partir de ADN de la piel 1 día después de la NIVS; carril 15, un subfragmento del gen de fibra amplificado por Fb5.2 y Fb3.2 a partir de ADN de la piel 1 día después de la NIVS; carril 16, un subfragmento del gen de fibra amplificado por Fb5.2 y Fb3.2 a partir de ADN de la oreja 1 día después de la NIVS; carril 17, un subfragmento del gen de fibra amplificado por Fb5.2 y Fb3.2 a partir de ADN de nódulo linfático 1 día después de la NIVS; carril 18, un subfragmento del gen de fibra amplificado por Fb5.2 y Fb3.2 a partir de ADN de hígado 1 día después de la NIVS; carril 19, un subfragmento del gen de fibra amplificado por Fb5.2 y Fb3.2 a partir de ADN extraído de sangre completa 1 día después de la NIVS. El ADN de los nódulos linfáticos se extrajo reuniendo nódulos linfáticos inguinales, cervicales y braquiales en disolución DNAZOL. El ADN se amplificó durante 35 ciclos a temperaturas de hibridación optimizadas en un termociclador Stratagene Robocycler de gradiente 40. Los fragmentos de ADN amplificado se fraccionaronen gel de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio.

Ejemplo de referencia 19

Un agente depilador no es necesario para la NIVS

Para determinar si un agente depilador, tal como NAIR (Tang *et al.*, 1997) es necesario para la NIVS, se compararon las titulaciones de anticuerpos producidas por parches de vacunas con o sin un pretratamiento utilizando NAIR. La figura 17 demuestra que las titulaciones de anticuerpos en ratones sin pretratamiento con NAIR son tan altas como sus homólogas del pretratamiento con NAIR. La eliminación de NAIR simplifica el procedimiento de NIVS.

En la figura 17, los ratones fueron inyectados por vía intradérmica (ID) con una dosis de 10^8 pfu, o se inmunizaron de un modo no invasivo (NIVS) pipeteando 10^8 pfu de AdCMV-hcea (Tang *et al.*, 1997) sobre la piel abdominal, seguido de la extensión del vector como una película fina sobre la piel desnuda con un trozo del parche Tegaderm (3M). Los vectores no absorbidos se lavaron. Se ensayaron muestras de suero para detectar anticuerpos anti-CEA 4 semanas después de la inoculación. Se determinaron las titulaciones de IgG anti-CEA mediante ELISA utilizando CEA humano purificado (CalBiochem) como antígeno de captura. Las muestras de suero e IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa (Promega) se incubaron secuencialmente sobre las placas durante 1 hora a temperatura ambiente con un lavado a fondo entre cada incubación. El criterio de valoración se calculó como la dilución de suero que produce la misma DO_{450} que una dilución 1/100 de suero preinmunológico. Al suero negativo a la menor dilución ensayada se le asignaron unas titulaciones de criterio de valoración de 1. Los datos se representaron gráficamente como la media geométrica de las titulaciones de critero de valoración de ELISA, en las que n = 4 para ID, n = 14 para 1 hr, n = 10 para NAIR(-), y n = 15 para NAIR/rasurado(-). ID, inyección intradérmica; 1 hr, los vectores se

pusieron en contacto con la capa externa de la piel durante una hora con rasurado y pretratamiento con NAIR; NAIR(-), los vectores se pusieron en contacto con la capa externa de la piel durante la noche con rasurado pero sin pretratamiento con NAIR; NAIR/rasurado(-),los vectores se pusieron en contacto con la capa externa de la piel durante la noche pero sin rasurado ni pretratamiento con NAIR.

Ejemplo de referencia 20

Tal como se muestra en la figura 18, ratones BALB/c (3 meses de edad) se inmunizaron mediante una diversidad de modalidades de vacunación, incluyendo la inyección intramuscular de ADN, la aplicación tópica o la inoculación intranasal de una vacuna del tétanos basada en adenovirus. La vacunación no invasiva dirigida a la piel se realizó pipeteando aproximadamente 10^8 pfu de AdCMV-tetC sobre la piel abdominal prerrasurada, seguido de la extensión del vector como una película fina sobre la piel desnuda con un trozo del parche Tegaderm (3M). Los vectores no absorbidos se lavaron en una hora. Se administraron vacunas nasales pipeteando aproximadamente 10^7 pfu de AdCMV-tetC en la cavidad nasal. Todos los animales se inmunizaron 3 veces cada 3 semanas. Una semana después del último refuerzo, los ratones se expusieron a una dosis letal de *Clostridium tetani* mediante una inyección en la almohadilla plantar y se controlaron a diario para la supervivencia. Los datos se representan gráficamente como el porcentaje de supervivencia frente a los días después de la exposición. Control no expuesto, ratones no expuestos sin vacunación antes de la exposición. Ad-tetC:NIVS, ratones inmunizados mediante la aplicación tópica de AdCMV-tetC; Ad-tetC:IN, ratones inmunizados mediante la inoculación intranasal de AdCMV-tetC; pCMV-tetC:IM, ratones inmunizados mediante la inyección intramuscular de 100 g de ADN de pCMV-tetC. AdCMV-tetC, un vector adenovírico que codifica el fragmento C de la toxina de *Clostridium tetani*; pCMV-tetC, un vector de expresión plasmídico que codifica el fragmento C de la toxina de *Clostridium tetani*. Los números entre paréntesis representan el número de animales para cada tratamiento.

Los ejemplos en la presente que implican la administración nasal también ilustran que se puede lograr una respuesta adecuada a través de la administración mucosa, y que las membranas mucosas, tales como las de la cavidad oral, pueden emplearse como vías para la administración, por ejemplo, la administración bucal y perlingual están previstas por la invención y se demuestran y analizan mediante los ejemplos en la presente que implican la administración nasal, así como por las enseñanzas generales en la presente.

Por tanto, la invención incluye la aplicación de una vacuna de vector recombinante que contiene una o más inserciones genéticas que codifican un antígeno o un epitopo de interés o un estímulo inmunológico, o un producto génico a partir de una vacuna recombinante, a la superficie bucal de la cavidad oral, con lo que el producto o productos codificados por el gen o genes insertados producen una respuesta inmunológica que puede ser protectora o terapéutica contra una enfermedad infecciosa. La invención también incluye dicha vacuna de vector recombinante o producto génico de una vacuna recombinante incorporada sobre, dentro o adherida a una matriz, que forma un mecanismo vehículo a partir del cual pueden liberarse los productos para la inmunización sobre la superficie bucal o hacia la cavidad oral. La invención incluye también las realizaciones en las que la matriz en la cual se cual se incorpora el producto para la inmunización puede ser bioactiva o inactiva, y está compuesta de materiales que mantienen la integridad de los productos para la inmunización; por ejemplo, el material de matriz puede estar compuesto de sustancias poliméricas, tales como glucosa u otros azúcares que sean biodegradables, u otras sustancias biodegradables, o materiales que sean desechables pero puede que no sean biodegradables.

Tabla 1: Detección de la expresión de transgenes a partir de vectores genéticos administrados mediante una venda, ensayándose la piel para la luciferasa

Tiempo de incubación (horas)	LU por cm^2 de piel
1	0
1	2.100
2	0
2	0
2	6.200
2	7.300
2	13.000
2	48.000
2	1.800
2	13.000

Tiempo de incubación (horas)	LU por cm^2 de piel
18	830
18	2.400
18	260
18	630
18	1.300.000
18	24.000
18	2.700
18	280

Tabla 2: Resumen del traslado de ADN de AdCMV-PR8.ha tras la aplicación tópica

Momento	Pinna de la oreja	Piel abdominal[a]	Nódulos linfáticos[b]	Bazo	Hígado	Riñón	Sangre	Músculo[c]
I. Gen de HA de longitud casi completa								
3 horas	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1 día	0/3	2/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
1 mes	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
II. Subfragmento del gen de HA								
3 horas	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1 día	1/3	3/3	3/3	1/3	2/3	2/3	2/3	2/3
1 mes	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
III. Gen de fibra de longitud casi completa								
3 horas	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1 día	1/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
1 mes	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
IV. Subfragmento de fibra								
3 horas	0/2	2/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
1 día	1/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
1 mes	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

Los ratones se inmunizaron mediante la aplicación tópica de AdCMV-PR8.ha como se describió en los anteriores ejemplos y figuras, por ejemplo, la descripción referida a la figura 1. En los momentos indicados, se extrajo el ADN total de los tejidos y se amplificó mediante PCR utilizando conjuntos de cebadores específicos según se describió en los anteriores ejemplos y figuras, por ejemplo, la descripción referida a la figura 3. Los datos se presentan como número de animales que contienen señales detectables para un tejido concreto por número total de animales analizados. [a] Sitio de administración; [b] nódulos linfáticos reunidos; [c] cuádriceps de la pata trasera.

Tabla 3: Resumen del traslado de ADN de pCMV-PR8.ha tras la inyección intramuscular

Momento	Pinna de la oreja	Piel abdominal	Nódulos linfáticos[a]	Bazo	Hígado	Riñón	Sangre	Músculo[b]
I. Gen de HA de longitud casi completa								
3 horas	2/3	0/3	3/3	1/3	0/3	0/3	1/3	3/3
1 día	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3
1 mes	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
II. Subfragmento del gen de HA								
3 horas	3/3	1/3	3/3	2/3	3/3	2/3	3/3	3/3
1 día	2/3	1/3	2/3	1/3	3/3	2/3	2/3	3/3
1 mes	1/2	1/2	2/2	1/2	1/2	0/2	0/2	1/2

Los ratones se inmunizaron mediante una inyección intramuscular de ADN de pCMV-PR8.ha como se describió en los anteriores ejemplos y figuras, por ejemplo, la descripción referida a la figura 1. En los momentos indicados, se extrajo el ADN total de los tejidos y se amplificó mediante PCR utilizando conjuntos de cebadores específicos según se describió en los anteriores ejemplos y figuras, por ejemplo, la descripción referida a la figura 3. Los datos se presentan como número de animales que contienen señales detectables para un tejido concreto por número total de animales analizados.[a] Nódulos linfáticos reunidos; [b] cuádriceps de la pata trasera (sitio de administración).

Tabla 4: Resumen del traslado de ADN de AdCMV-PR8.ha tras la aplicación de vectores adenovíricos termoinactivados

Momento	Pinna de la oreja	Piel abdominal[a]	Nódulos linfáticos[b]	Bazo	Hígado	Riñón	Sangre	Músculo[c]
I. Gen de HA de longitud casi completa								
1 día	0/3 (3/7)	1/3 (7/7)	0/3 (1/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)
II. Subfragmento del gen de HA								
1 día	0/3 (4/7)	3/3 (7/7)	0/3 (2/7)	0/3 (1/7)	0/3 (1/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)
III. Gen de fibra de longitud casi completa								
1 día	0/3 (2/7)	2/3 (6/7)	0/3 (1/7)	0/3 (0/7)	0/3 (1/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)	0/3 (0/7)
IV. Subfragmento de fibra								
1 día	0/3 (2/7)	3/3 (7/7)	0/3 (2/7)	0/3 (0/7)	0/3 (2/7)	0/3 (1/7)	0/3 (1/7)	0/3 (0/7)

Resumen del traslado de ADN de AdCMV-PR8.ha tras la aplicación tópica: Se inactivaron partículas de AdCMV-PR8.ha mediante un calentamiento a 95 ºC durante 10 min. Los vectores se administraron a ratones mediante aplicación tópica, tal como se describió en los anteriores ejemplos y figuras, por ejemplo, la descripción referida a la figura 1, o mediante una inyección intradérmica de una cantidad equivalente de vectores utilizando una aguja. Un días después de la administración de genes localizada se extrajo el ADN total de diversos tejidos. Los genes de HA y de fibra de longitud casi completa y sus subfragmentos se amplificaron mediante PCR utilizando conjuntos de cebadores específicos, según se describe en la leyenda de la figura 3. Los datos se presentan como número de animales que contienen señales detectables para un tejido concreto por número total de animales analizados. Los números sin paréntesis representan la aplicación tópica; los números entre paréntesis representan la inyección intradérmica. [a] Sitio de administración; [b] nódulos linfáticos reunidos; [c] cuádriceps de la pata trasera. Importancia: Es posible que el ADN del vector pueda trasladarse a tejidos lejanos tras la aplicación tópica mediante tres mecanismos diferente: (1) translocación a través de la piel mediante difusión, seguida por traslado mediante la circulación; (2) translocación a través de la piel, seguido de la posterior captación pinocitótica hacia el interior de células presentadoras de antígenos (APC); (3) transducción de queratinocitos, seguido de una transferencia intracelular de biomoléculas exógenas hacia las APC. Aunque los vectores adenovíricos termoinactivados fueron incapaces de

transducir células, tal como se demuestra por su incapacidad para producir efectos citopáticos (CPE) en células 293 humanas probablemente debido a la desnaturalización de ligandos fundamentales (por ejemplo, motivo CAR y RGD), siguen siendo capaces de difundirse hacia la piel como hacen los vectores vivos si se produjese la difusión. Los resultados demuestran que no es probable que el principal mecanismo que media en la translocación del ADN de vector tras la NIVS sea debido a la translocación a través de la piel mediante difusión. Por tanto, la aplicación tópica de vectores adenovíricos puede representar una modalidad de vacunación no invasiva, en lugar de transdérmica.

Referencias bibliográficas

Barry, M.A. *et al.*, Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization, *Nature*, 377, 632-635 (1995).

Conry, R.M. *et al.*, A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine for human clinical use, *Cancer Gene Ther.*, 2, 33-38 (1995).

Cotten, M. *et al.*, High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase) gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6094-6098 (1992).

Glenn, G.M. *et al.*, Skin immunization made possible by cholera toxin, *Nature*, 391, 851 (1998).

Gómez-Foix *et al.*, Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism, *J. Biol. Chem.*, 267, 25129-25134 (1992).

Johnston, S.A. y Tang, D.-c., Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization, *Meth. Cell Biol.*, 43, 353-365 (1994).

McDonnell, W.M. y Askari, F.K., DNA vaccines, *New Engl. J. Med.*, 334, 42-45 (1996).

Tang, D.-c. *et al.*, Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response, *Nature*, 356, 152-154 (1992).

Tang, D.-c. *et al.*, Butyrate-inducible and tumor-restricted gene expression by adenovirus vectors, *Cancer Gene Ther.*, 1, 15-20 (1994).

Tang, D.-c. *et al.*, In vivo citotoxicity assay for assessing immunity, *J. Immunol. Methods*, 189, 173-182 (1996).

Tang, D.-c. *et al.*, Vaccination onto bare skin, *Nature*, 388, 729-730 (1997).

REIVINDICACIONES

1.- El uso de un vector adenovírico para la preparación de una vacuna no invasiva para la administración mucosa, en el que el vector contiene y expresa un ácido nucleico exógeno que codifica un antígeno de la hemaglutinina de la gripe o un epitopo de este y/o un antígeno de la proteína nuclear de la gripe o un epitopo de este, y el vector tiene delecionadas las regiones E1 y E3, y en el que la vacuna no invasiva para la administración mucosa se va a administrar a la mucosa nasal.

2.- El uso según la reivindicación 1, en el que la expresión en un animal de un antígeno de la hemaglutinina de la gripe o un epitopo de este y/o un antígeno de la proteína nuclear de la gripe o un epitopo de este, estimula o modula una respuesta inmunológica contra la gripe.

3.- El uso según la reivindicación 2, en el que la respuesta es inducida por el vector que expresa el ácido nucleico en las células de un animal.

4.- El uso según la reivindicación 2 o 3, en el que el animal es un vertebrado.

5.- El uso según la reivindicación 4, en el que el vertebrado es un ave o un mamífero.

6.- El uso según la reivindicación 4, en el que el vertebrado es un ser humano, o un animal de compañía, domesticado, productor de alimento o de pienso, ganado, de caza, de carreras, o deportivo.

7.- El uso según la reivindicación 5, en el que el animal es una vaca, un caballo, un perro, un gato, una cabra, una oveja, un cerdo, o un pollo, un pato o un pavo.

8.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector adenovírico comprende un adenovirus humano.

9.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el vector adenovírico comprende un adenovirus canino.

10.- El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el vector adenovírico comprende un vector vírico al que se le han delecionado todos los genes víricos.

11.- Un vector adenovírico que contiene y expresa un ácido nucleico exógeno que codifica un antígeno de la hemaglutinina de la gripe o un epitopo de este y/o un antígeno de la proteína nuclear de la gripe o un epitopo de este, y que tiene delecionadas las regiones E1 y E3, para su uso como vacuna no invasiva para la administración mucosa, en el que que la vacuna no invasiva para la administración mucosa se va a administrar a la mucosa nasal.

12.- Un vector adenovírico para su uso según la reivindicación 11, en el que el expresión en un animal de un antígeno de la hemaglutinina de la gripe o un epitopo de este y/o un antígeno de la proteína nuclear de la gripe o un epitopo de este, estimula o modula una respuesta inmunológica contra la gripe.

13.- Un vector adenovírico para su uso según la reivindicación 12, en el que la respuesta es inducida por el vector que expresa el ácido nucleico en las células del animal.

14.- Un vector adenovírico para su uso según la reivindicación 12 o 13, en el que el animal es un vertebrado.

15.- Un vector adenovírico para su uso según la reivindicación 14, en el que el vertebrado es un ave o un mamífero.

16.- Un vector adenovírico para su uso según la reivindicación 14, en el que el vertebrado es un ser humano, o un animal de compañía, domesticado, productor de alimento o de pienso, ganado, de caza, de carreras, o deportivo.

17.- Un vector adenovírico para su uso según la reivindicación 15, en el que el animal es una vaca, un caballo, un perro, un gato, una cabra, una oveja, un cerdo, o un pollo, un pato o un pavo.

18.- El vector adenovírico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el vector adenovírico comprende un adenovirus humano.

19.- El vector adenovírico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, en el que el vector adenovírico comprende un adenovirus canino.

20.- El vector adenovírico para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en el que el vector adenovírico comprende un vector vírico al que se le han delecionado todos los genes víricos.

21.- Una vacuna no invasiva para la administración mucosa que comprende un vector adenovírico, en la que el vector contiene y expresa un ácido nucleico exógeno que codifica un antígeno de la hemaglutinina de la gripe o un epitopo de este y/o un antígeno de la proteína nuclear de la gripe o un epitopo de este, y en la que el vector tiene delecionadas las regiones E1 y E3, para su uso para estimular una respuesta inmunológica contra la gripe en un animal, en la que la vacuna no invasiva para la administración mucosa se va a administrar a la mucosa nasal.

22.- Una vacuna no invasiva para su uso según la reivindicación 21, en la que el animal es un vertebrado.

23.- Una vacuna no invasiva para su uso según la reivindicación 22, en la que el vertebrado es un ave o un mamífero.

24.- Una vacuna no invasiva para su uso según la reivindicación 22, en la que el vertebrado es un ser humano, o un animal de compañía, domesticado, productor de alimento o de pienso, ganado, de caza, de carreras, o deportivo.

25.- Una vacuna no invasiva para su uso según la reivindicación 23, en la que el animal es una vaca, un caballo, un perro, un gato, una cabra, una oveja, un cerdo, o un pollo, un pato o un pavo.

26.- Una vacuna no invasiva para su uso según la reivindicación 21, en la que el vector adenovírico comprende un adenovirus humano.

27.- Una vacuna no invasiva para su uso según la reivindicación 21, en la que el vector adenovírico comprende un adenovirus canino.

28.- Una vacuna no invasiva para la administración mucosa para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en la que el vector adenovírico comprende un vector vírico al que se le han delecionado todos los genes víricos.

29.- Un kit que comprende una vacuna no invasiva para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 28 que comprende, en un primer recipiente, el vector y, en un segundo recipiente, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para administrar el vector por vía intranasal, en el que los recipientes están opcionalmente presentes en el mismo envase o están en envases separados; y el kit opcionalmente contiene instrucciones para mezclar el vector y el vehículo o diluyentes y/o la administración.

30.- El kit según la reivindicación 29, que comprende además un dispositivo de administración en un tercer recipiente, en el que el tercer recipiente está opcionalmente presente en el mismo envase que uno o ambos del primer y segundo recipiente, o está en un envase separado del primer y segundo recipiente; y en el que el kit contiene opcionalmente instrucciones para instalar el vector o el vector y el vehículo o el diluyente dentro o sobre el dispositivo de administración y/o para la administración o la aplicación del dispositivo de administración.

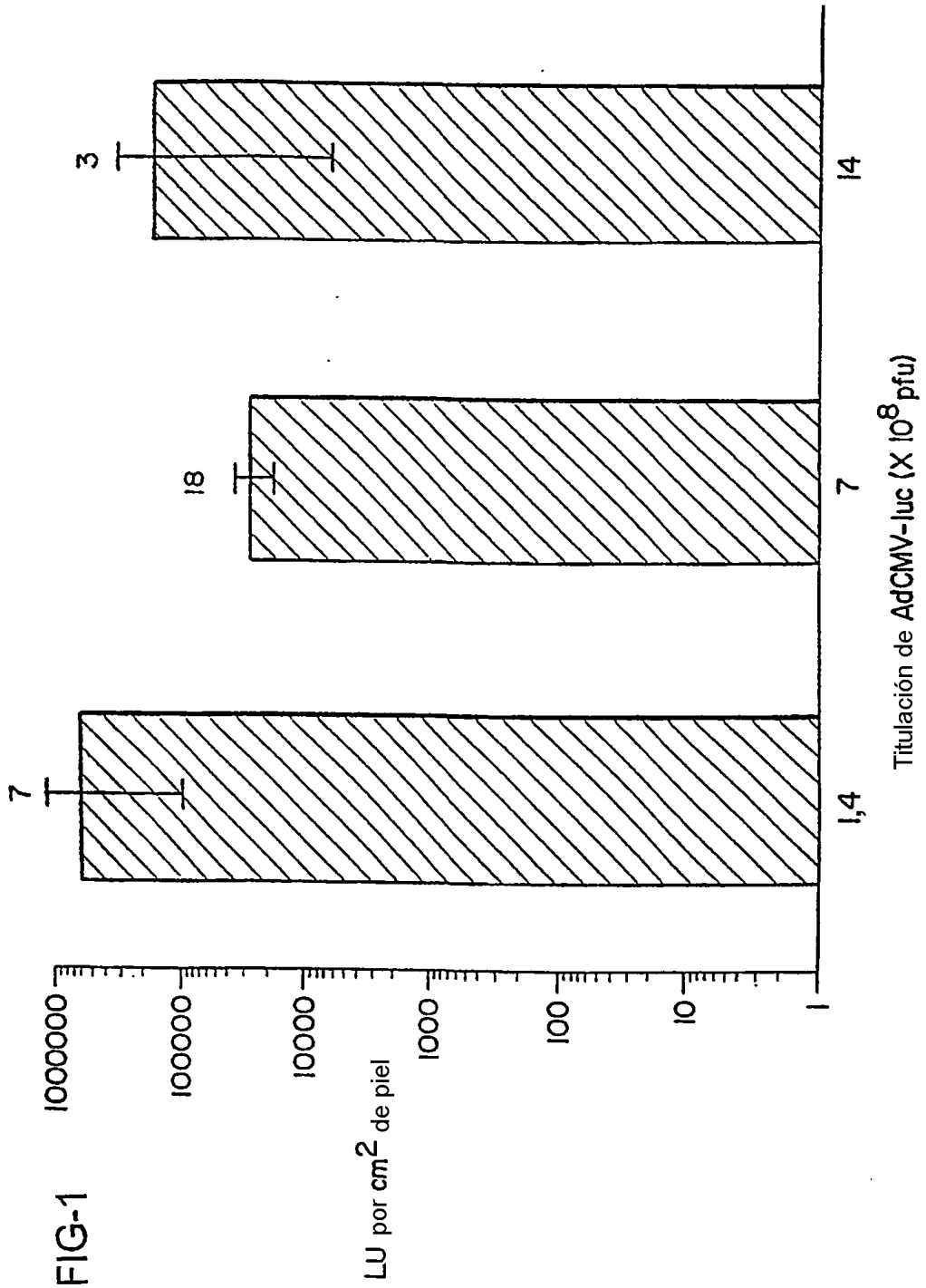

1000000
100000
10000
1000
100
10
1
LU por cm2 de piel
7
18
3
1,4
7
14
Titulación de AdCMV-luc (X 10^8 pfu)

FIG-1

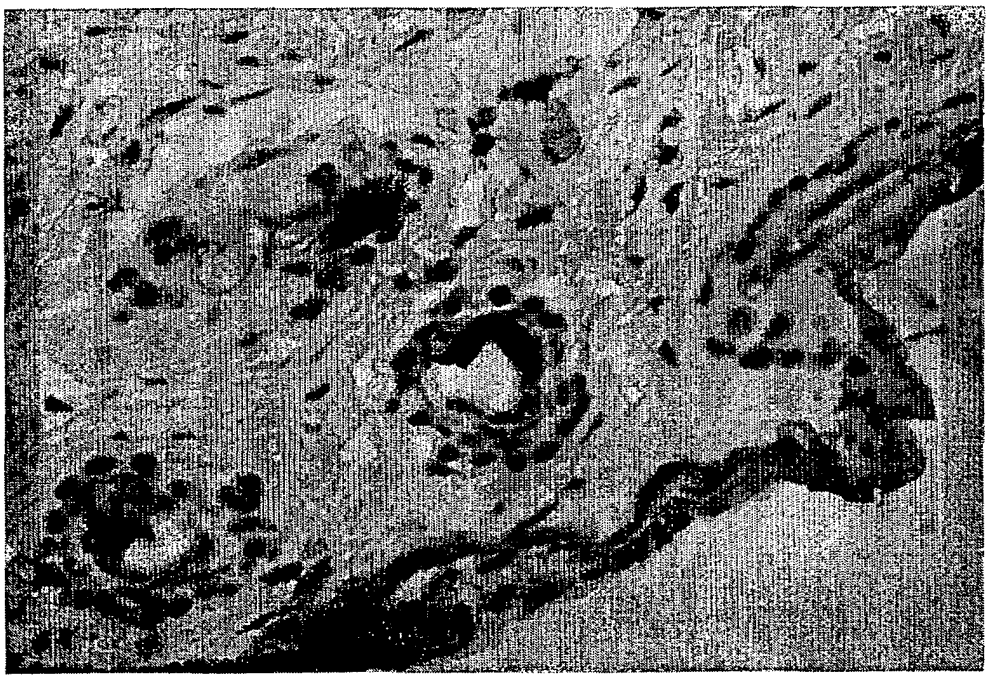


FIG- 2A

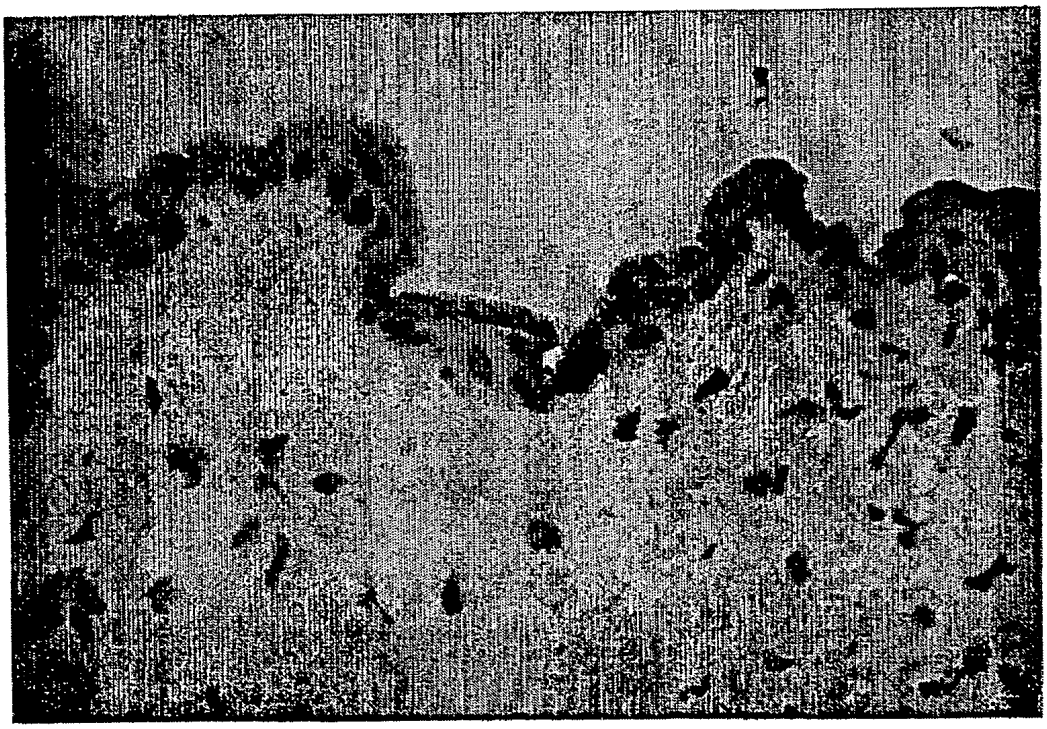


FIG- 2B

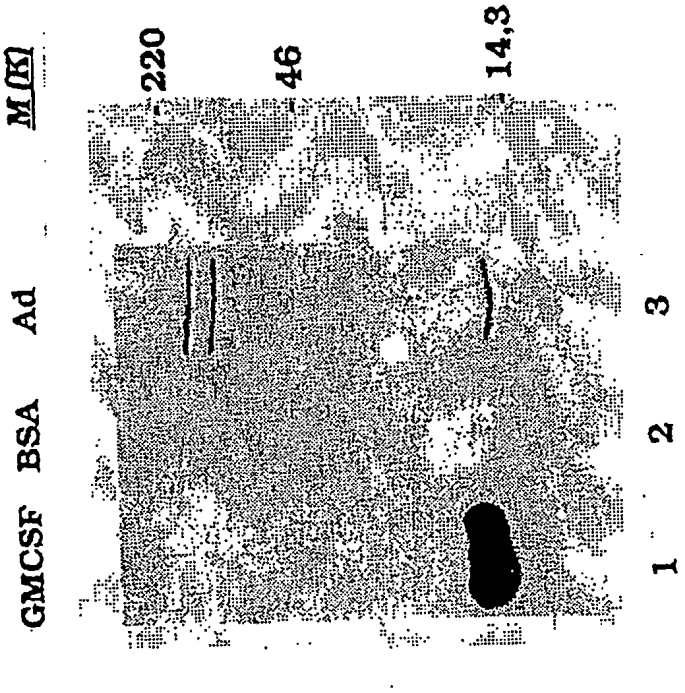


FIG-3B

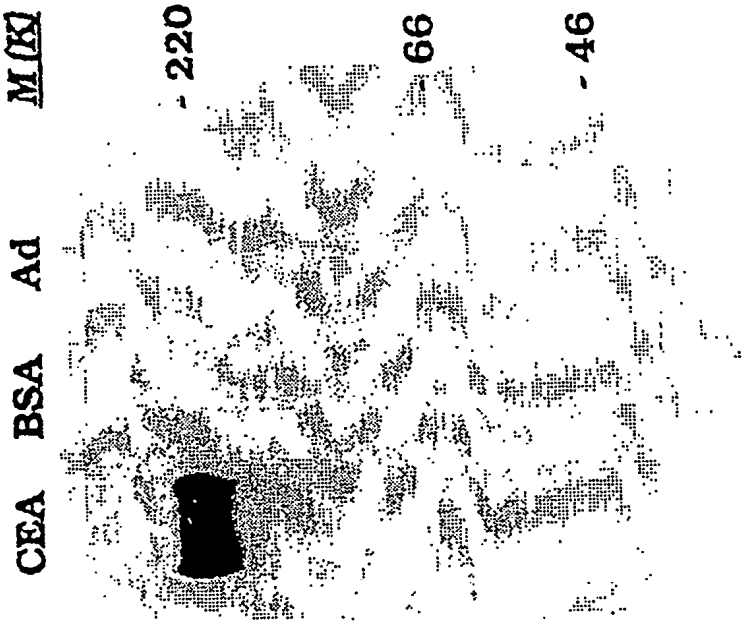


FIG-3A

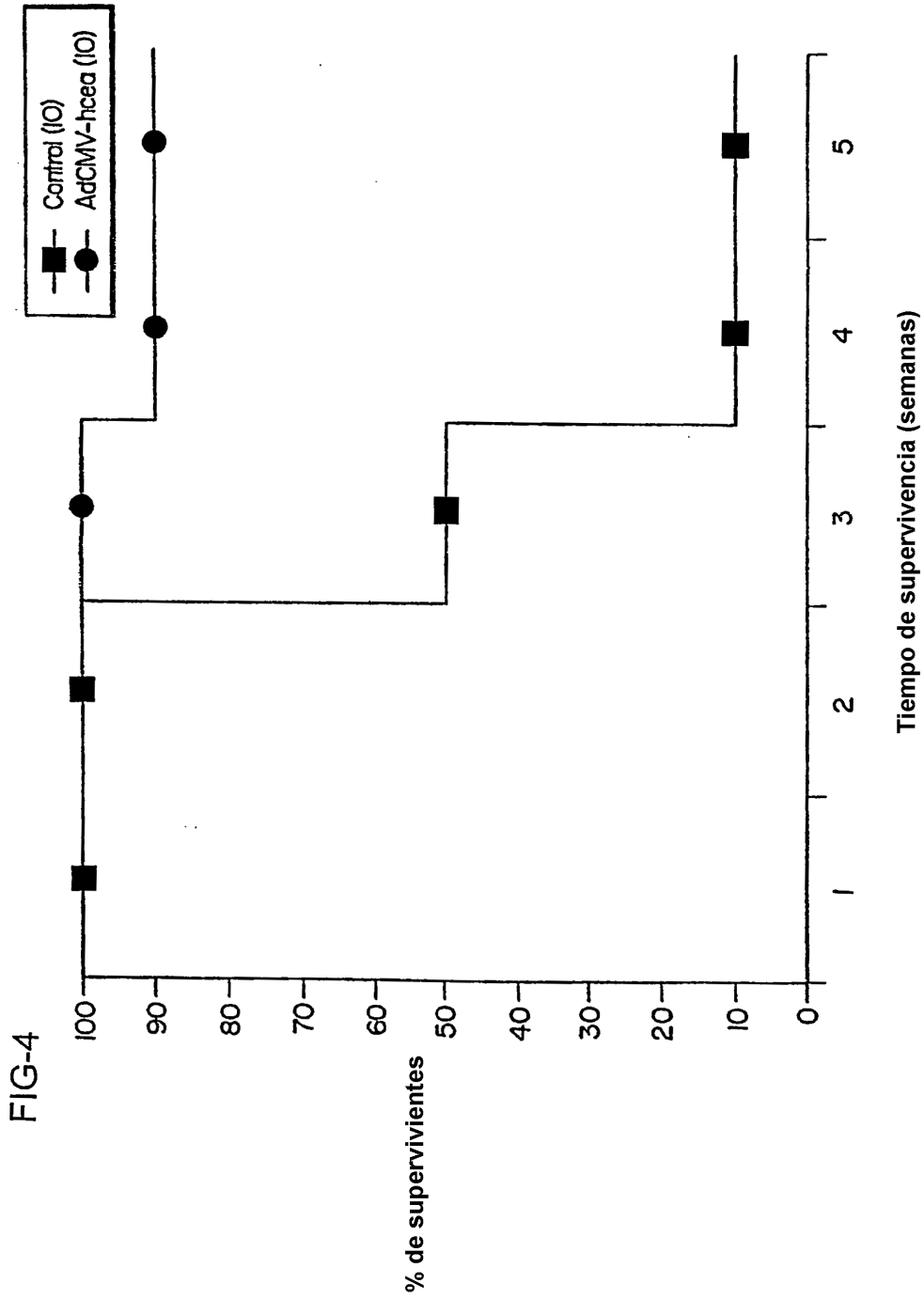

Control (IO)
AdCMV-hcea (IO)
% de supervivientes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
2
3
4
5
Tiempo de supervivencia (semanas)

FIG-4

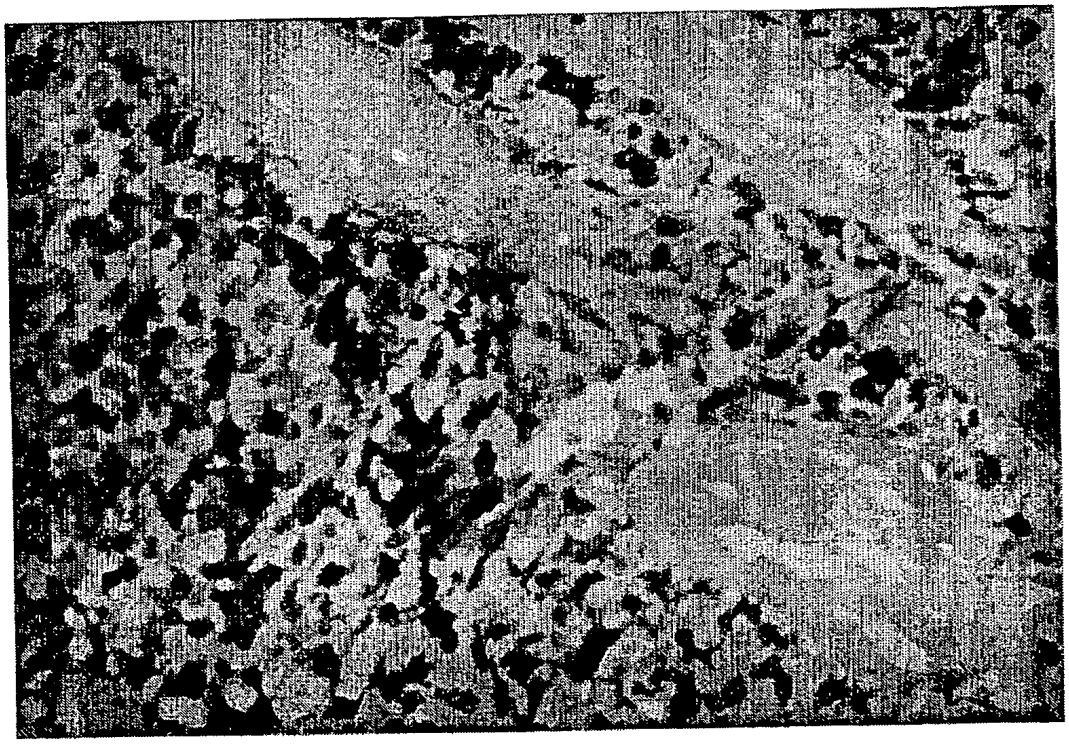


FIG- 5

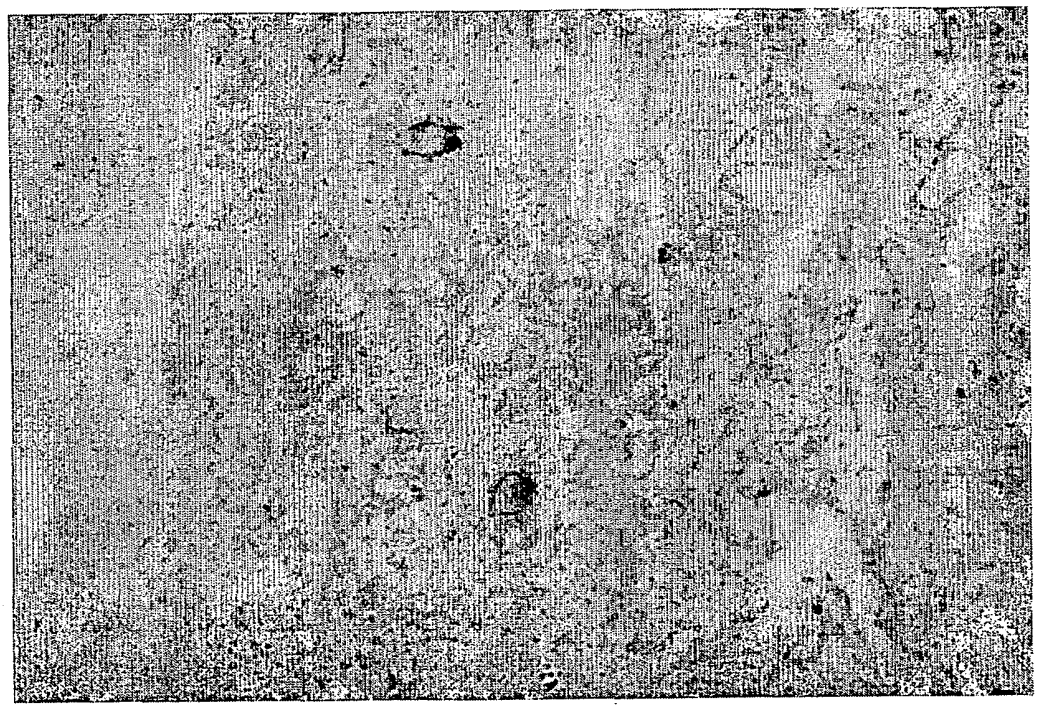


FIG-6

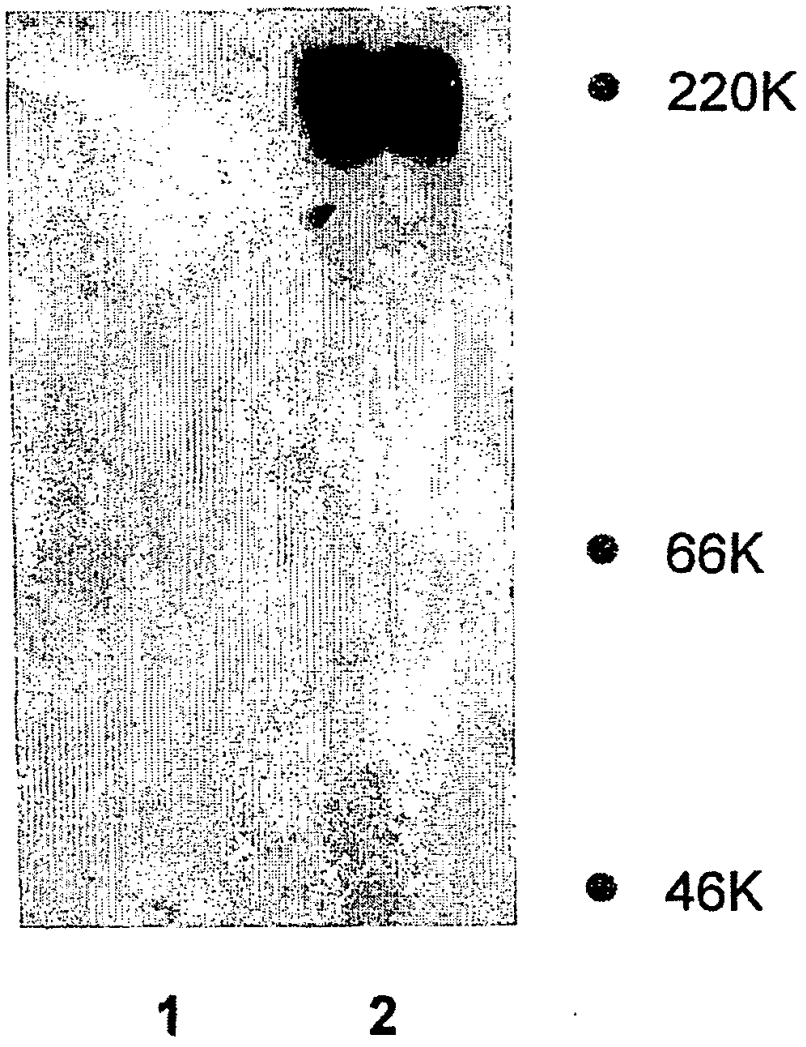


FIG-7

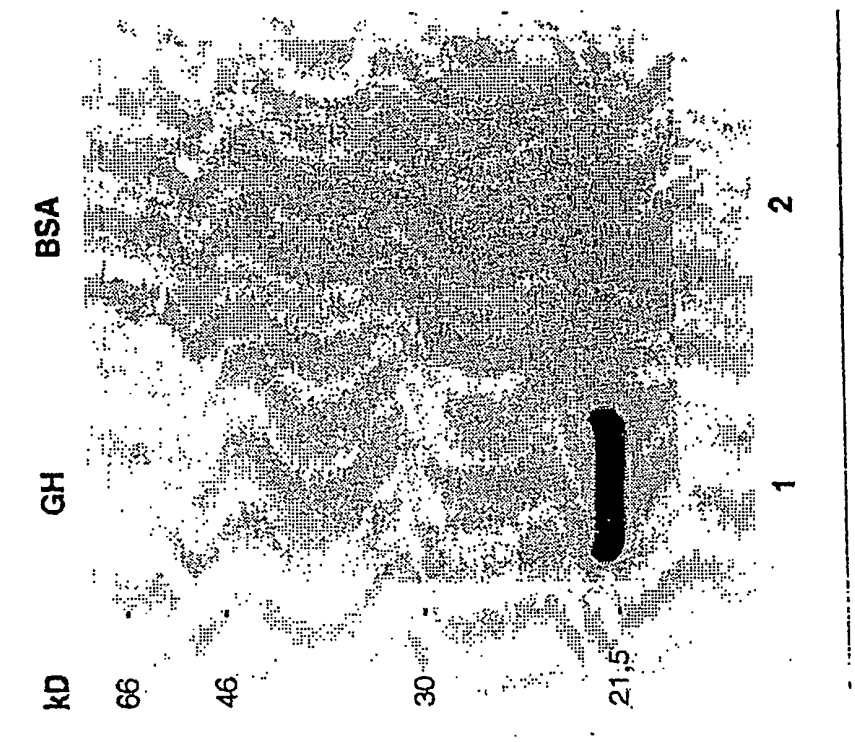

kD
66
46
30
21,5
GH
BSA
1
2
ADN/liposomas

FIG-8B

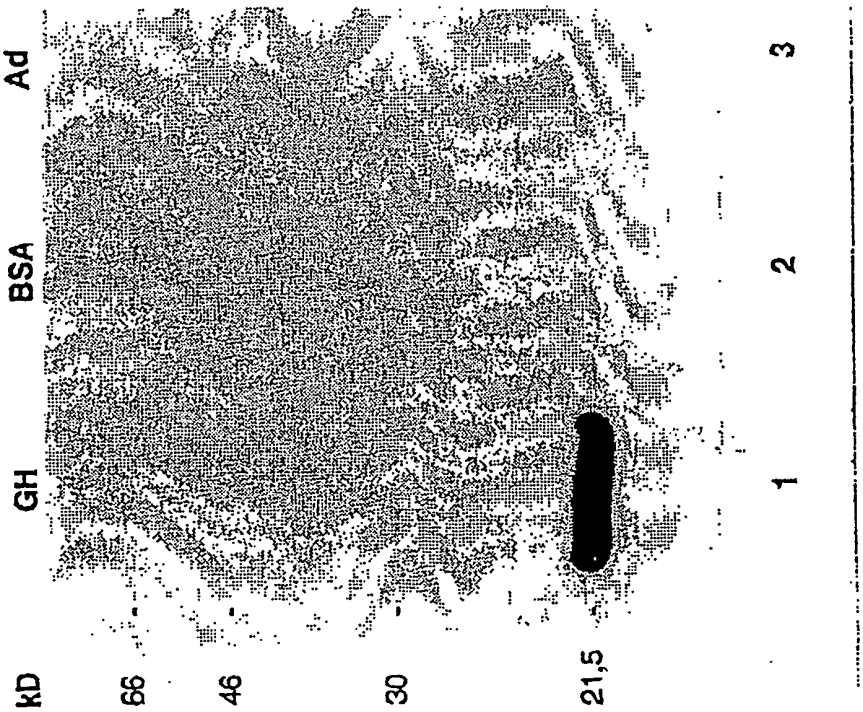

kD
66
46
30
21,5
GH
BSA
Ad
1
2
3
ADN/Ad

FIG-8A

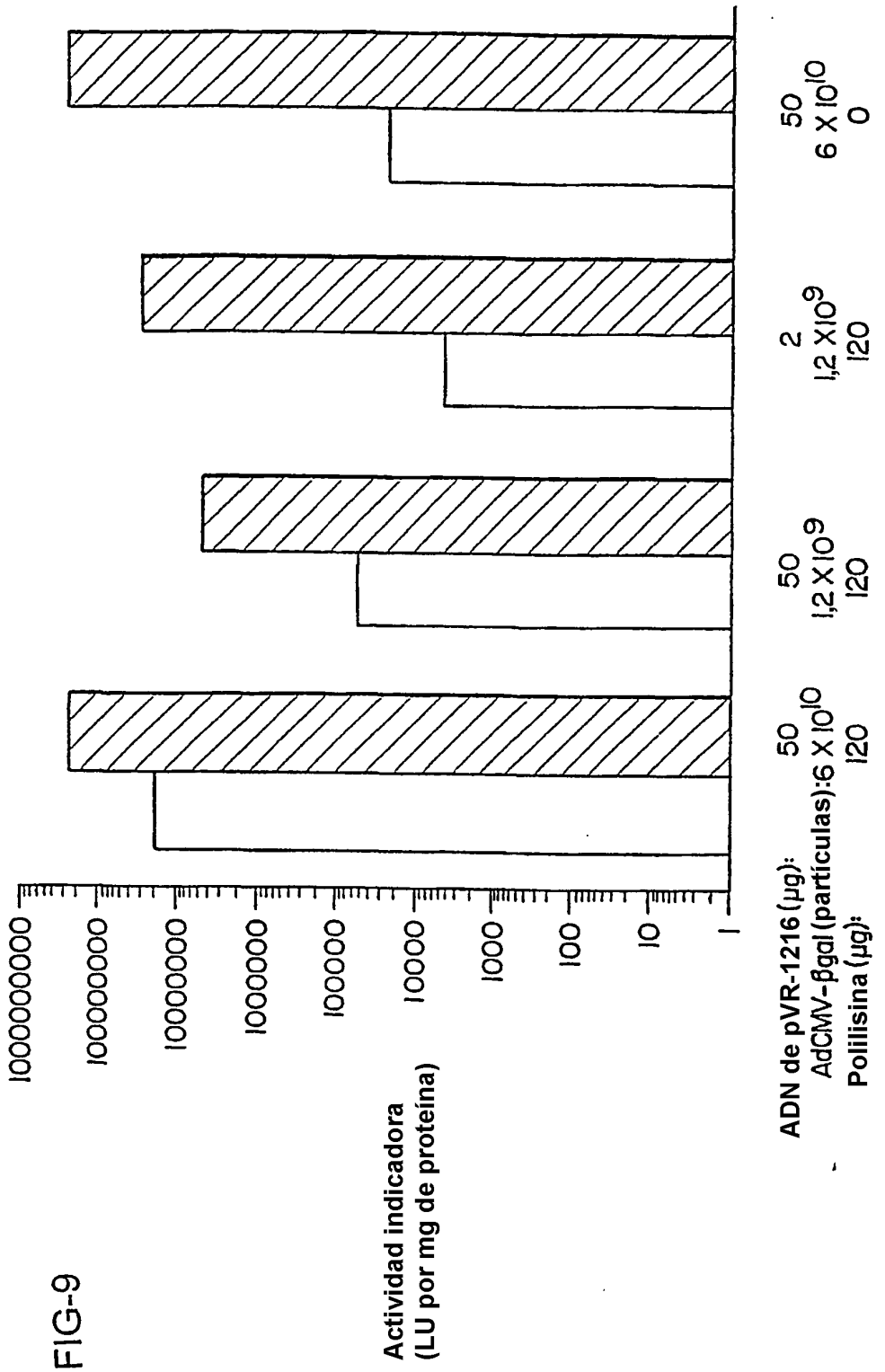

1000000000
100000000
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Actividad indicadora
(LU por mg de proteina)
ADN de pVR-1216 (µg):
AdCMV-βgal (partículas):
Polilisina (µg):
50
6 X 10^10
120
50
1,2 X 10^9
120
2
1,2 X 10^9
120
50
6 X 10^10
0

FIG-9

FIG-10

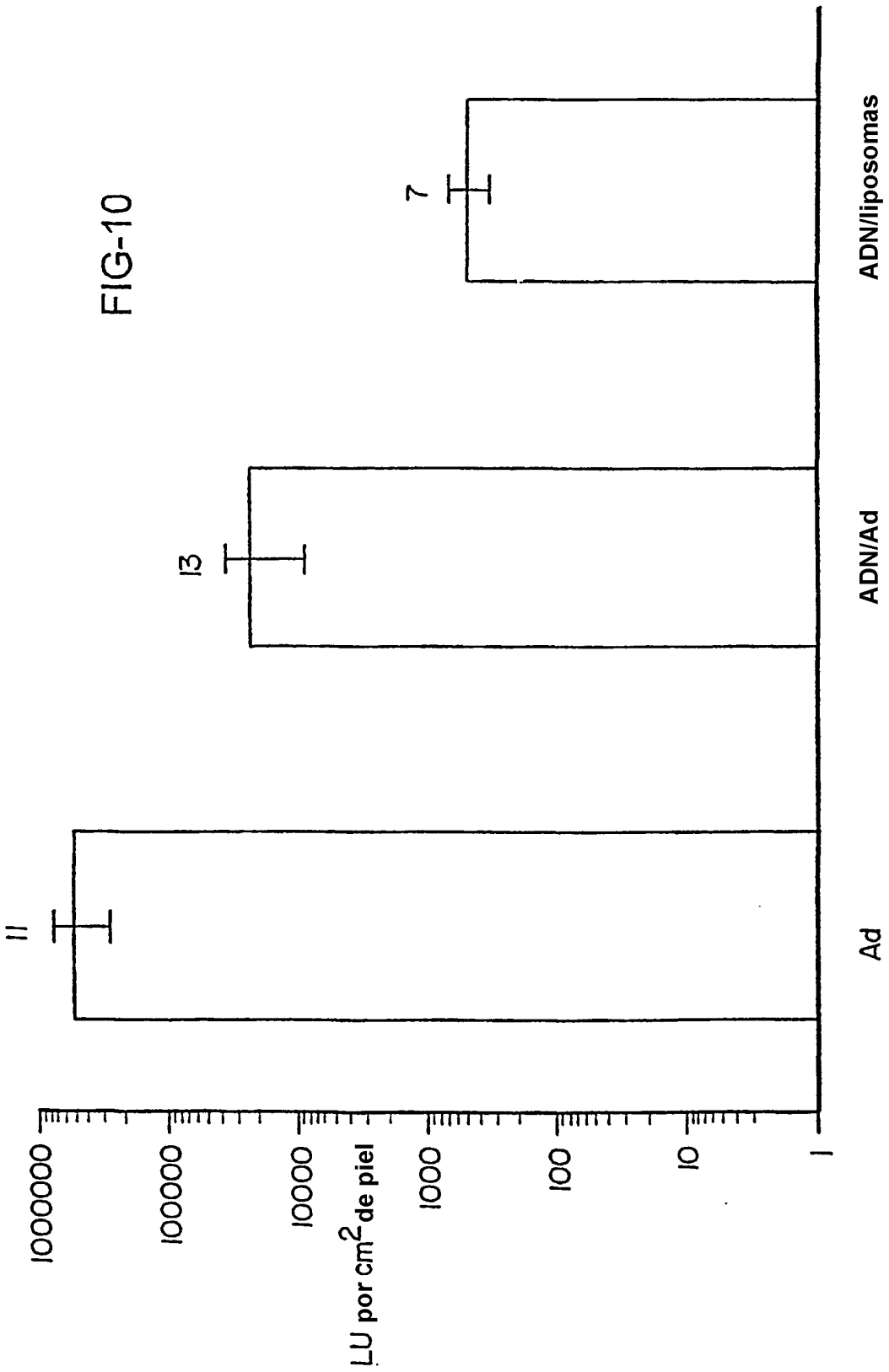
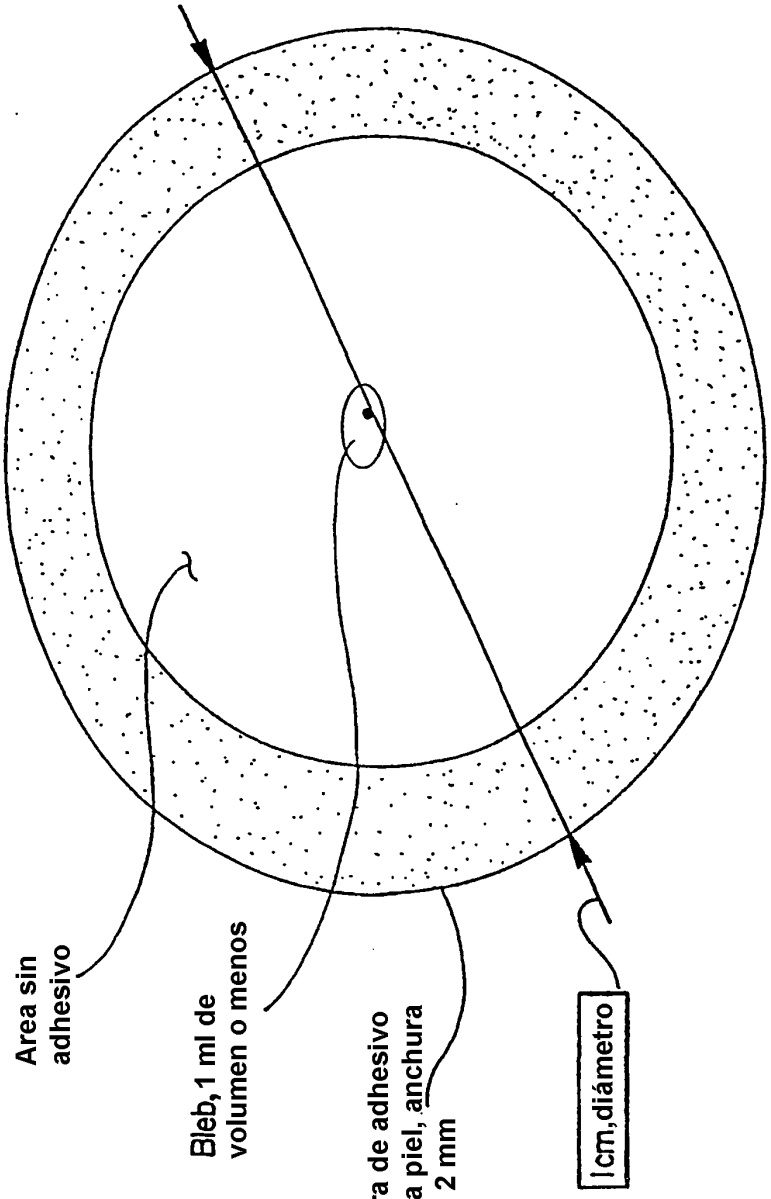

11
13
7
Ad
ADN/Ad
ADN/liposomas
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
LU por cm2 de piel

FIG-11


Area sin adhesivo
Bleb,1 ml de volumen o menos
Tira de adhesivo a la piel, anchura de 2 mm
1cm,diámetro

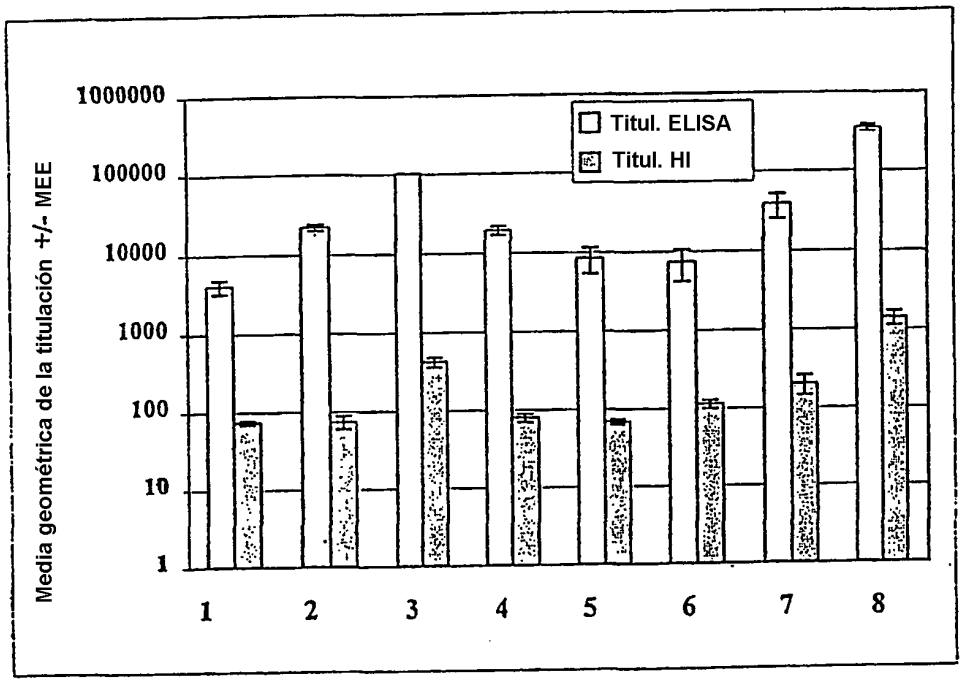

Media geométrica de la titulación +/- MEE
1000000
100000
10000
1000
100
10
1
Titul. ELISA
Titul. HI
1
2
3
4
5
6
7
8

FIG-12

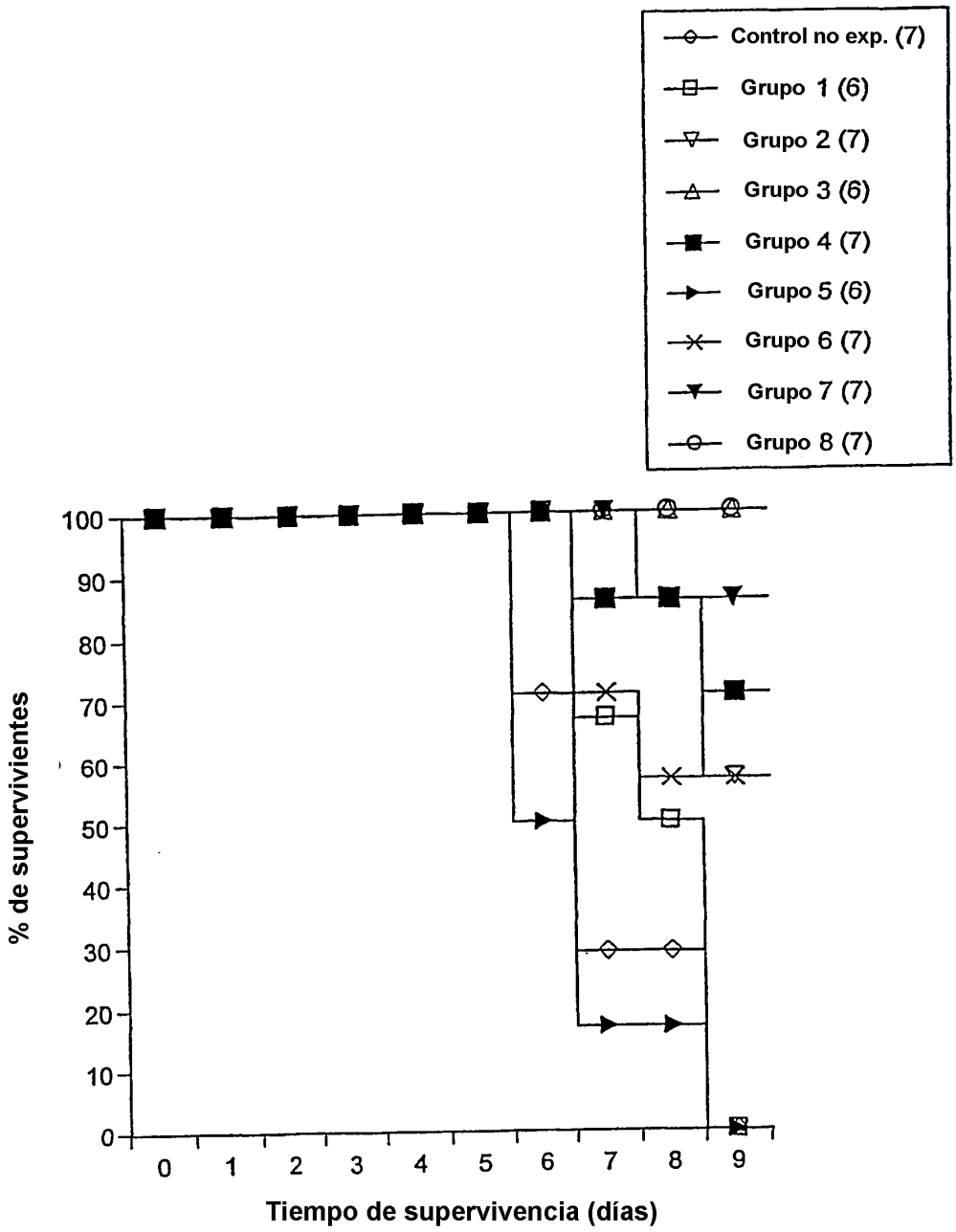
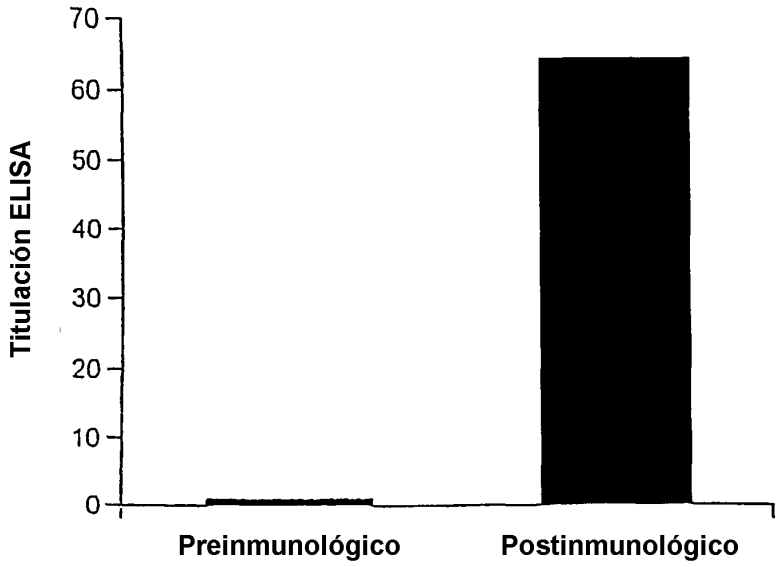
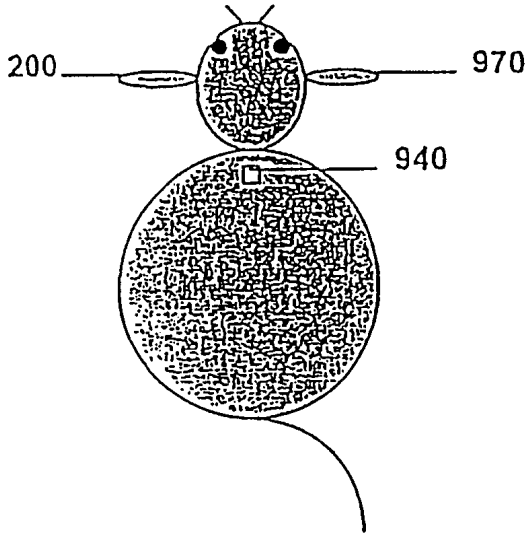

Control no exp. (7)
Grupo 1 (6)
Grupo 2 (7)
Grupo 3 (6)
Grupo 4 (7)
Grupo 5 (6)
Grupo 6 (7)
Grupo 7 (7)
Grupo 8 (7)
% de supervivientes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Tiempo de supervivencia (días)

FIG-13



Anticuerpos mediante ELISA generados por el vector AdCMV-PR8ha en un macaco cola de cerdo.

FIG-14



Traslado de las manchas de luciferasa en la piel después de la administración tópica de un vector adenovírico.

FIG-15

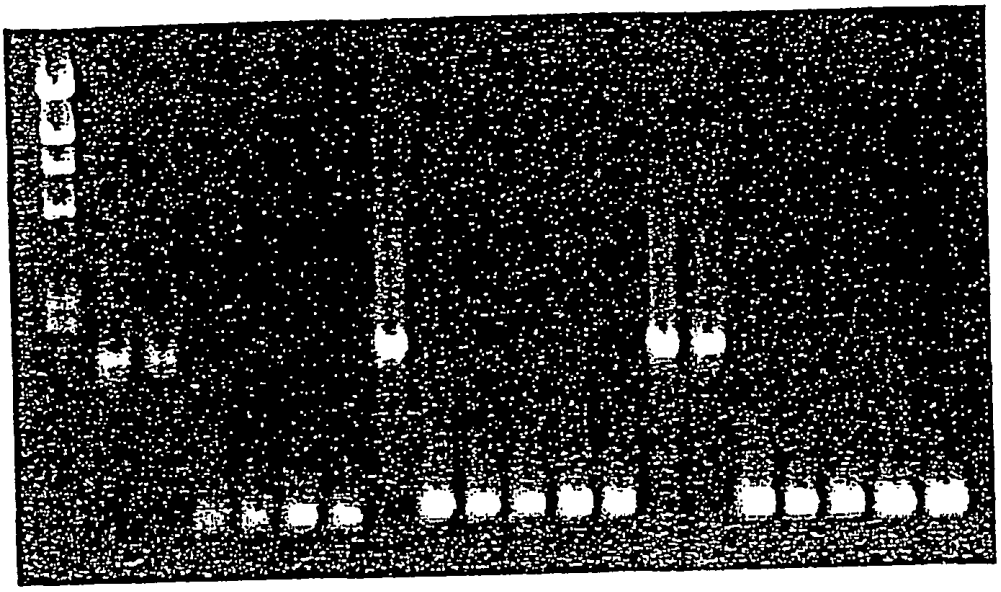
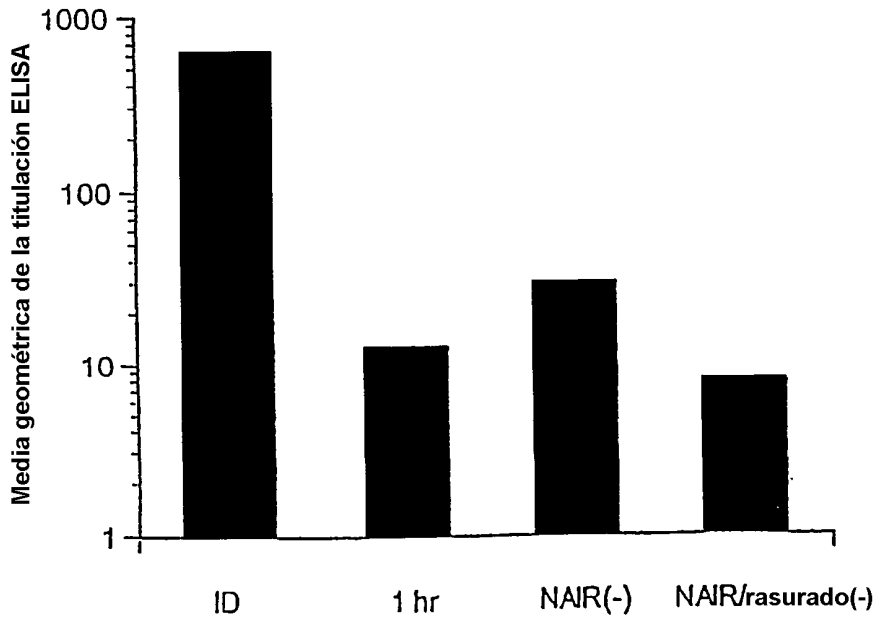


FIG-16



Anticuerpos mediante ELISA generados en ratones por parches de vacunas con o sin un pretratamiento utilizando un agente depilador.

FIG-17

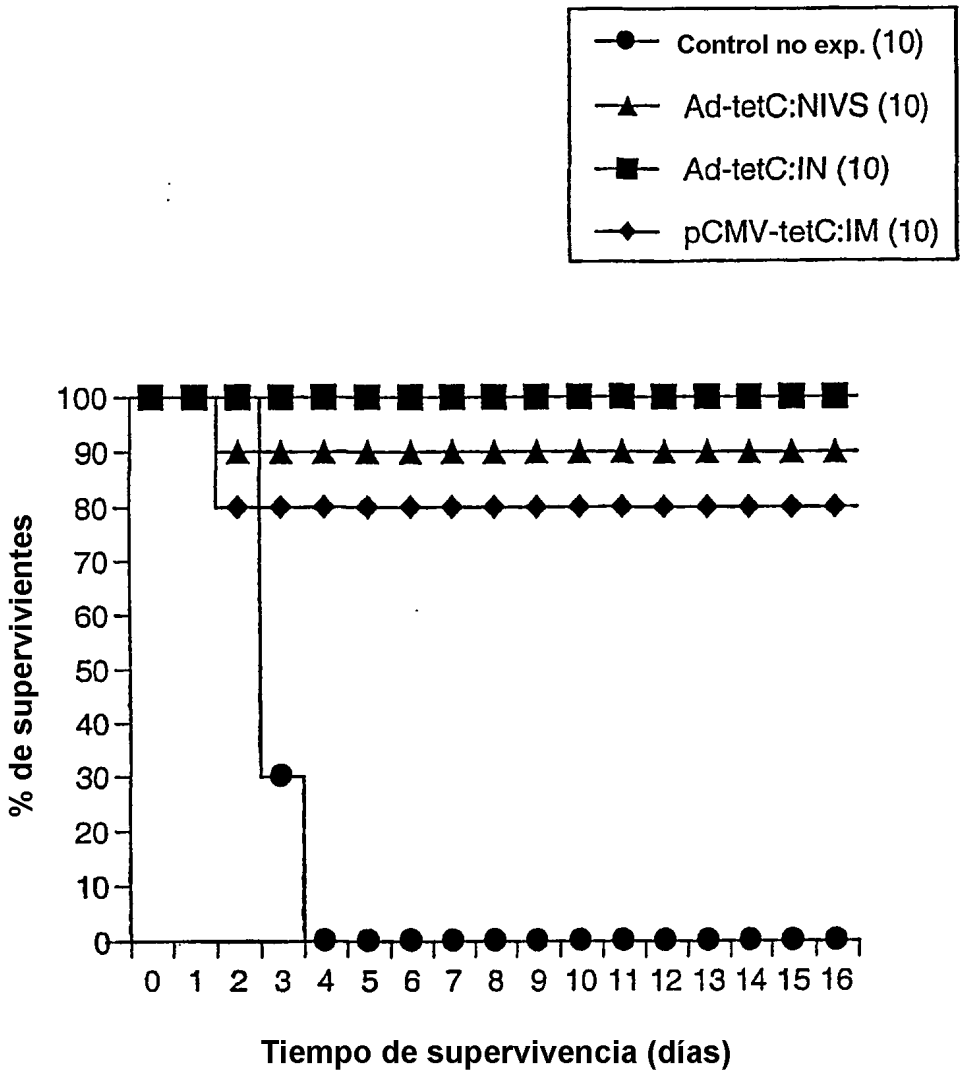

Control no exp. (10)
Ad-tetC:NIVS (10)
Ad-tetC:IN (10)
pCMV-tetC:IM (10)
% de supervivientes
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
Tiempo de supervivencia (días)

FIG-18